



Središnja medicinska knjižnica

Novosel, Irena (2015) *Pokazatelji intenziteta intoksikacije terminske posteljice duhanskim dimom [Indicators of the intensity of intoxication of the term placenta by tobacco smoke]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/2236>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Irena Novosel

**Pokazatelji intenziteta intoksikacije
terminske posteljice
duhanskim dimom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014

**Disertacija je izrađena
u Klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu,
te u Općoj bolnici „Dr Ivo Pedišić“ u Sisku**

Voditelj rada: prof. dr.sc. Damir Babić

Zahvala svim kolegicama i kolegama koji su pomogli pri izradi ove disertacije,
a osobito mojoj obitelji, prijateljima i mentoru koji su mi bili podrška sve ove godine.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. HIPOTEZA.....	15
3. CILJEVI RADA.....	16
4. ISPITANICI I METODE.....	17
5. REZULTATI.....	25
6. RASPRAVA.....	65
7. ZAKLJUČCI.....	91
8. SAŽETAK.....	93
9. SUMMARY.....	94
10. LITERATURA.....	95
11. ŽIVOTOPIS.....	107
12. DODACI.....	108

POPIS OZNAKA I KRATICA

SS – marginalna struja dima cigarete

MS – središnja struja dima cigarete

SIDS – sindrom iznenadne dojenačke smrti

OP – kontrolna skupina roditelja neizloženih duhanskom dimu

PP – skupina roditelja pasivno izložena duhanskom dimu

AP – skupina roditelja aktivno izložena duhanskom dimu

KP – skupina roditelja aktivno i pasivno izložena duhanskom dimu

Si – Skalarni indeks

KNi – kvantitativni indeks

KVi – kvalitativni indeks

MIP – morfološki indeks posteljice

IHIP – imunohistokemijski indeks posteljice

IIP – intoksikacijski indeks posteljice

SSS – srednja stručna sprema

NSS – niska stručna sprema

VSS – visoka stručna sprema

s.s. – stupnjevi slobode

R – koeficijent korelacije ($-1 < R < +1$)

p – statistička značajnost ($p < 0,0500$)

CO – ugljikov monoksid

1. UVOD

1.1. Posteljica

Posteljica (grč. plakous - plosnati kolač) je organ čija kompleksna anatomija, patologija i fiziološki aspekti pobuđuju značajan interes za proučavanje, tim više što posteljica može biti ključna u otkrivanju novorođenčadi u kojih postoje opasnosti od razvoja zdravstvenih komplikacija.¹ Objektivna, temeljita i dobro dokumentirana analiza može otkriti važne podatke za intrauterino i neonatalno praćenje i skrb.²

Kompleksno poimanje problematike vezane uz posteljicu temelji se na specifičnoj morfologiji terminske posteljice koja se dijeli na korionske resice ili vilozni parenhim, pupkovinu, ovoje i maternalno decidualno tkivo. Normalna terminska posteljica teži između 400-600g, dok prosječna veličina mjeri 18x16x2,3 cm, sa 16 do 20 kotiledona smještenih u okruglastoj, diskoidnoj ili srcolikoj posteljici. Dužina pupkovine u terminskom porođaju iznosi od 55-65 cm sadržavajući dvije arterije i jednu venu. Ovoji nalikuju nježnoj i prozirnoj vreći plavkastog odsjaja. Decidua je nerijetko oljuštena s viloznog parenhima tijekom poroda, te očuvane dijelove treba tražiti na korionskom sloju ovoja. Patohistološkom analizom svakog navedenog dijela posteljice dolazi se do morfoloških karakteristika koje mogu govoriti o upalnom ili hipoksičnom odnosno toksičnom zbivanju u posteljici.¹

U složenosti, morfologiju posteljice nadilazi jedino njezina fiziologija. Uz nutritivnu, respiracijsku i ekskrecijsku funkciju, posteljica ima također endokrinu, te protektivnu ulogu koja se odražava kroz uteroplacentarnu membranu.³

1.2. Duhanski dim

Duhanski dim je najrasprostranjeniji osobni i okolišni zagađivač. Iako već u uporabi u zapadnoj civilizaciji preko 400 godina, pušenje je fenomen vezan uz dvadeseto stoljeće s rastućim medicinskim i ekonomskim posljedicama. U industrijaliziranim zemljama pušenje cigareta je glavni uzrok kroničnih bolesti, nesposobnosti i preuranjene smrti.⁴

Postoji mnogo tipova duhana, no za proizvodnju cigareta koristi se *Nicotiniana tabacum* ili obični duhan. Oko 90% sadržaja cigarete je porijekla biljke duhana, dok je 10% kombinacija kemijskih i drugih aditiva. Nikotin je moćan stimulans središnjeg živčanog sustava, te se prirodno nalazi u lišću duhana. Klasificira se kao droga u mnogim zemljama i upravo je ovisnost o nikotinu razlog stvaranja navike pušenja. Nikotin se inhalira sagorijevanjem lišća duhana (u obliku cigareta, cigara, lula, itd.) ili se apsorbira kroz sluznicu usne šupljine žvakanjem. Proizvođači radi poboljšanja okusa dodaju niz dodataka. Upravo sagorijevanjem tih poboljšivača i duhana nastaje katran koji je skraćeno ime za solidne dijelove nađene u duhanskom dimu.⁵

Iako nije utvrđen prag izlaganja cigaretnom dimu koji bi bio uzrokom razvoju niza bolesti, postoje nesumnjivi dokazi koji ukazuju da dugogodišnje pušenje povećava vjerojatnost utjecaja na zdravlje. Naime, pušenje je odgovorno za više od 85% karcinoma pluća, te za karcinome usne šupljine, jednjaka, grkljana, želuca, gušterače, grlića maternice, bubrega, mokraćovoda, mokraćnog mjehura i debelog crijeva. Također se veže i s leukemijom. Potvrđena je povezanost s bolestima kardiovaskularnog sustava, te sa smrću uzrokovanom moždanim udarom. Ciliotoksični materijali nađeni u duhanskom dimu oštećuju obložni epitel respiratornog sustava uzrokujući povećanje sekrecije bronhalnog mukusa, te kronično slabljenje pulmonarne i mukocilijarne funkcije.⁶

1.2.1. Aktivno pušenje

Cigaretni dim je heterogeni aerosol koji nastaje nepotpunim sagorijevanjem lišća duhana. Sastoji se od plinova i nekondenziranih isparina. Tzv. središnja struja dima (SS) ili eng. *mainstream smoke* nastaje uvlačenjem dima, dok tzv. marginalna struja (MS) ili eng. *sidestream smoke* nastaje od dima na gorućem dijelu, te ispuhivanjem dima iz usta. Sastojak dima uvjetovan je s nekoliko činilaca: sastojaka samog duhana, temperature sagorijevanja, dužine cigarete, poroznosti papira, vrste aditiva i filtera. Glavni sastojci duhanskog lišća su ugljikohidrati, nemasne organske kiseline, te kemijski sastojci koji sadrže dušik i smolu. Temperatura varira od 30°C u ustima do 900°C na gorućem kraju. U prisutnosti visoke temperature, pojedini sastojci duhana prolaze termičku razgradnju ili pirolizu. Nestabilne molekule se rekombiniraju

stvarajući nove sastojke (pirosinteza). Sastojci u dimu se filtriraju kroz nesagoreni duhan i redestiliraju na gorućem kraju, dok neki tijekom cijelog procesa ostaju nepromijenjeni.⁴

SS čini oko 92 do 95% ukupne mase dima. Dušik, kisik, te ugljikov monoksid (CO) čine oko 85% cigaretnog dima. CO je toksični plin koji interferira s transportom kisika i njegovim iskorištavanjem. Cigaretni dim sadrži od 2 do 6% CO. Pušači udišu koncentraciju CO od 400 mg/l i razvijaju povišenu razinu karboksihemoglobina. Razina karboksihemoglobina nađena u pušača varira od 2 do 15 posto, razina za nepušače je blizu 1%. Prosječno se u pušača nalazi oko 5% karboksihemoglobina. CO utječe na organske sustave reducirajući razinu oksihemoglobina i mioglobina što je uobičajeni uzrok blage policitemije i može izazvati blago oštećenje CNS-a odnosno stvara se stanje trajne hipoksije.⁴

Iako je kemijski sastojak oba tipa dima kvalitativno sličan, s obzirom da oba dolaze iz sagorijevajućeg duhana, ipak postoje neke značajne razlike između MS i SS. Temperatura pri kojoj se stvara MS je mnogo viša nego ona pri kojoj nastaje SS, što rezultira većom količinom očuvanih organskih kemijskih produkata u SS nego u MS, a to pak sugerira veću karcinogenost SS nego MS pri istoj koncentraciji.⁶

Do danas je otkriveno više od 4700 kemijskih sastojaka duhanskog dima uključujući i 60 poznatih karcinogena koji mogu uzrokovati, potaknuti ili pospješiti razvoj karcinoma. Podjela toksičnih komponenata prema US Surgeon General Reports on the Health Consequences of Smoking jest ona na primarno toksične, ciliotoksične, karcinogene i su-karcinogene odnosno promotore (eng. pomagač, podupirač, promicatelj), od kojih većina ima kombinirano djelovanje. Karcinogenici se dijele u četiri osnovne skupine spojeva: policiklički aromatski ugljikovodici, N-nitrozoaminski spojevi, aromatski amini i metali u tragovima.⁷

Reakcije tkiva i organskih sustava na cigaretni dim su višestruke i složene. Većina studija se bavi utjecajem na zdravlje glavnih sastojaka dima kao što su nikotin ili CO, dok se znatno manje zna o utjecajima i međudjelovanjima ostalih potencijalno toksičnih sastojaka koji su prisutni u niskim koncentracijama.

1.2.2. Pasivno pušenje

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) definira pasivno pušenje kao udahnuti dim kojega osobe udišu kada se nalaze u istom zračnom prostoru kao i pušači. U hrvatskoj terminologiji pojam pasivnog pušenja odnosi se na udio duhanskog dima koje nevoljno udahne nepušač boraveći u istom prostoru s pušačem. U anglosaksonskoj literaturi se koristi nekoliko termina: passive smoking, unvoluntary smoking, enviromental smoking ili second hand smoking. Pasivno pušenje primarno potiče iz SS, te zapravo sadrži toksične i karcinogene tvari kao i SS, čak i više nego MS. Pasivno pušenje je nesumnjivo uzročnik brojnih bolesti uključujući maligne i nemaligne bolesti respiratornog sustva, kao i bolesti srednjeg uha u eksponirane djece. Smatra se da pasivno pušenje uzrokuje 3000 karcinoma pluća godišnje samo u Sjedinjenim Državama, uz druge bolesti kao kronični kašalj, smanjenu plućnu funkciju i bronhokonstrikciju.⁶

Brojna istraživanja pokušavaju utvrditi utjecaj pasivnog pušenja na posteljicu i fetalni razvoj. Zanimljiv je rezultat studije Hrube i sur. koji su pokazali da je broj prijevremeno rođene novorođenčadi bio veći u majki izloženih samo pasivnom pušenju nego u majki koje su bile aktivni pušači.⁸

1.3. Utjecaj duhanskog dima na trudnoću, intrauterini i ekstrauterini razvoj djeteta

Pušenje može odgoditi koncepciju, te za vrijeme trudnoće na različite načine utjecati na fetus. U prosjeku su djeca, čije su majke pušile za vrijeme trudnoće, 170 g lakša od djece majki nepušačica. Ovaj efekat se veže s oštećenjem uteroplacentarne membrane.⁸ Majčino pušenje za vrijeme trudnoće povećava rizik spontanog pobačaja,⁹ smrti fetusa, neonatalne smrti, te sindroma iznenadne dojenačke smrti (SIDS).¹⁰ Simetrično zaostajanje u rastu nakon 22. tjedna trudnoće naziva se fetalnim duhanskim sindromom (eng. fetal tobacco syndrome).¹¹⁻¹⁴ Ovaj rizik se znatno povećava u kombinaciji s rizičnom trudnoćom druge etiologije.⁴ Tako su Larsen i sur. utvrdili kako pušenje uzrokuje značajno manju gestacijsku dob novorođenčadi, težinu i dužinu, osobito u majki koje puše 11-20 cigareta na dan.¹⁵ Luciano i sur. to direktno povezuju s promjenama posteljice koje reduciraju njezinu

funkcionalnost.¹⁶ Prethodno navedeno ukazuje na ovisnost opisanih odstupanja o broju popušanih cigareta dnevno. Pušenje roditelja je osim toga povezano s visokim rizikom od respiratornih infekcija i poremećenog razvoja plućne funkcije u djece.⁴ Opisuje se utjecaj pušenja na majčino mlijeko tijekom dojenja, na razvoj infekcija srednjeg uha, dok se SIDS u posljednje vrijeme osobito povezuje s pasivnim pušenjem.⁶

1.4. Utjecaj duhanskog dima na posteljicu

Značenje uteroplacentarne membrane leži u činjenici kako svaki patološki proces razvijen na bilo kojoj od struktura koje ju sačinjavaju dovodi do poremećaja funkcije posteljice. Naime, krv majke koja se nalazi u interviloznim prostorima, od krvi djeteta u korionskim krvnim žilama, odvojena je stanicama trofoblasta, stromom resica, te stijenkom kapilara korionskih resica koje zajedno čine uteroplacentarnu membranu. Tijekom intrauterinog razvoja uteroplacentarna-membrana se kvantitativno i kvalitativno mijenja, da bi u normalnoj terminskoj posteljici bio ostvaren gotovo neposredan dodir između dvaju krvotoka redukcijom trofoblasta, te rastom i sinusoidalnim širenjem kapilara na račun strome.³

Duhanski dim sadrži sastojke koji prolaze kroz posteljicu nakon aktivne ili pasivne ekspozicije cigaretama. Uz nikotin, CO, policiklički aromatski ugljikovodici, tiocijanat, duhanski dim sadrži i oko 30 iona metala uključujući kadmij, olovo, nikal, krom, arsen, aluminij, antimon, bakar, željezo, kao i radioaktivne elemente.¹⁷

Hipoteza pušenjem izazvane hipoksije (eng. smoking-induced hypoxia syndrome) temelji se na istraživanju morfoloških promjena posteljica u žena izloženih dimu cigareta koje su slične onima viđenima u drugim trudnoćama povezanim s hipoksičnim stresom fetusa.¹⁸ Smatra se kako upravo CO koji nastaje nepotpunim sagorijevanjem pridonosi nastanku sindroma hipoksije inducirane pušenjem. Naime, hemoglobin ima 250 puta veći afinitet prema CO nego prema kisiku zbog čega razina majčinog karboksihemoglobina može dosegnuti i 15%. Povećanje majčinog karboksihemoglobina na linearan način odražava i povećanje fetalnog karboksihemoglobina. Karboksihemoglobin povećava afinitet hemoglobina za kisik pomičući krivulju disocijacije kisika u oksihemoglobinu prema lijevo što znači da ga

hemoglobin lako veže, ali teško otpušta. Iako uslijed povećane fetalnomaternalne koncentracije karboksihemoglobina može doći do povećanog maternofetalnog transporta kisika, fetus ipak funkcionira u okolišu s reduciranim parcijalnim tlakom kisika.¹⁸

Razlikuju se tri modela porijekla placentarne hipoksije: preplacentarni model, placentarni ili uteroplacentarni i postplacentarni model. U preplacentarnoj hipoksiji reducirana je razina kisika u majčinoj krvi. Ova se situacija događa i u majki izloženih duhanskom dimu, ali i kod anemije majki, te trudnoćama žena koje žive na velikoj nadmorskoj visini. U uteroplacentarnom modelu, kompromitiran je ulaz normoksične krvi, što se događa u preeklampsijama koje karakterizira slaba arterijska cirkulacija, ali uredan kapacitet transporta kisika i uredan parcijalni tlak kisika. Postplacentarne hipoksije karakterizira ulaz normoksične krvi u maternalni dio placentarne cirkulacije, ali komplikacije unutar korionskih resica sprječavaju normalan primitak kisika u fetusa.¹⁹

Različiti oblici hipoksija izazivaju različite oblike morfoloških promjena unutar korionskih resica koje uključuju volumnu gustoću, grananje i proširenje fetalnih kapilara, promjene gustoće i proliferaciju citotrofoblasta, učestalosti sincicijskih čvorića uz promjenu efektivne difuzijske udaljenosti preko korionske membrane.¹⁸ Tako i pušenje, kao oblik preplacentarne hipoksije, dovodi do morfoloških promjena sličnih promjenama nađenim u žena koje žive na visokoj nadmorskoj visini (high-altitude pregnancies).^{20,21} Larsen je utvrdio kako posteljica pušača posjeduje smanjeni volumen fetalnih kapilara²² što se slaže sa Jacksonom²⁰, ali ne i Resetnikovom²¹. Povećanje interviloznog krvnog prostora također je potvrđeno u posteljicama majki koje puše²³ te u trudnoća na velikoj nadmorskoj visini²⁰. Suprotno rezultatima studija koje prate trudnoće na velikoj nadmorskoj visini, žene pušači pokazuju zadebljanje korionske membrane.²⁴

Mnogi visoko reaktivni ioni metala, prije svega kadmij i olovo, koji su prisutni u visokim koncentracijama u duhanskom dimu, poznati su kao aktivni sudionici stvaranja oksidativnog stresa podupirući ulogu teških metala u posljedičnoj toksičnosti i karcinogenosti duhanskog dima.¹⁷

Zanimljivo je kako je porast zagađenja okoliša izazvao zabrinutost za zdravlje, s naglaskom na utjecaj zagađivača na esencijalni mineralni status stanovništva zemalja u razvoju.²⁵ Naime, cigaretni dim je glavni izvor ekspozicije kadmiju u nezagađenim područjima.¹⁷ Studije pokazuju kako vrlo malo kadmija prolazi kroz posteljicu, te da se većina kadmija koncentrira u posteljičnom tkivu.²⁶ Međutim niske, ali ne i nulte, vrijednosti koncentracije kadmija izmjerene u humanih fetusa ukazuju na to kako posteljica ipak nije potpuna barijera pri ekspoziciji kadmijem.²⁷ Studije na životinjama su pokazale kako akutna ali ne i kronična administracija kadmija u kasnoj gestacijskog dobi dovodi do placentarne nekroze s posljedičnom smrću fetusa zahvaljujući adaptacijskoj sposobnosti stanica trofoblasta u smislu sinteze i redistribucije placentalnog metalotioneina.²⁸⁻³⁰ Drugim riječima, niskomolekularna bjelančevina, metalotionein, koja veže cink, kadmij i bakar unutar stanica, utječući na zadržavanje cinka na razini posteljice, smanjuje biološku dostupnost ovog esencijalnog elementa.³¹ Pušenje pak inducira sintezu metalotioneina, te posredno utječe na usporeni fetalni razvoj.³² No, u istraživanjima je prisutna metodološka neujednačenost, koja dovodi do različitih rezultata, osobito što se tiče razine cinka u posteljicama majki koje puše. Tako je Piasek³³ pokazala nepromijenjenu razinu cinka u posteljici majki izloženih cigaretnom dimu, dok su statistički značajno povišenje razine cinka dokazali Ronco i sur.^{25,33} Ipak se većina istraživača slaže u sljedećem: u posteljicama majki izloženima cigaretnom dimu dokazane su više koncentracije kadmija, dok je koncentracija željeza i bakra reducirana.²⁵ Uz prethodno opisanu povezanost razine kadmija i snižene novorođenačke težine, potrebno je dodati kako manjak željeza tijekom trudnoće dovodi do anemije rezultirajući također smanjenjem novorođenačke tjelesne težine, te uzrokujući povećani rizik kardiovaskularnih bolesti u odrasloj dobi.^{34,45} Manjak bakra tijekom trudnoće je neuobičajen, no u eksperimentalnih životinja se povezuje s razvojem kardiovaskularnih bolesti, s abnormalnostima mozga i zastojem fetalnog rasta.³⁶ Također su posljednja istraživanja pokazala kako se nikal, jednom ušavši u dišni sustav majke, nakuplja u posteljici.³⁷ Georgieff i sur. smatraju kako nikal zbog interakcije s divalentnim prijenosnikom metala (DMT-1) remeti homeostazu željeza u sinciciotrofoblastu, smanjujući endosomski izlaz željeza, što vodi do kronične redukcije apsorpcije željeza iz maternalnog seruma.³⁸ Stvara se stanje stanične hipoksije koje može pojačati hipoksiju izazvanu pušenjem (eng. smoking-induced chronic hypoxia), pojačavajući ekspresiju gena involviranih u homeostazu željeza putem HIF-1.^{18,39}

Tako nastalo stanje hipoksije, bilo da je uvjetovano biokemijskim interakcijama koje dovode do manjka željeza u sinciotrofoblastu ili primarno preplacentarnom hipoksijom odnosno pušenjem, može aktivirati hormone povezane sa stresom koji pak mijenjajući metaboličke procese direktno utječu na intrauterini fetalni razvoj.³⁴

1.5. Utjecaj duhanskog dima na genom fetusa

Posljednje desetljeće zaista znači početak novog doba s obzirom na rezultate znanstvenih istraživanja koji su sada egzaktno uspjeli dokazati kako štetni sastojci duhanskog dima ne samo da morfološki mijenjaju strukturu posteljice već se izravno miješaju s genskom ekspresijom mijenjajući tako genetski prijelaz posteljice. Promjena transkripcije, ali i epigenetske promjene, nisu posljedica samo aktivnog pušenja, već nastaju i kod izlaganja pasivnom pušenju, iako s manjim brojem zahvaćenih gena.⁴⁰⁻⁴⁷

Kad bi se radilo samo o organu koji će nestati nakon devetomjesečnog života iz tijela trudnice, podatci kojima nas obasipaju znanstvenici ne bi bili tako zanimljivi. Naime, rezultati znanstvenika koji se bave utjecajem duhanskog dima na posteljicu, impliciraju samo jedno pitanje: što se događa s fetalnim genomom? Istraživanja genotoksičnih efekata duhanskog dima na fetalno tkivo pokazala su povećanu kromosomsku nestabilnost u stanicama amnionske tekućine, ali i krvi pupkovine novorođenčadi izložene aktivnom pušenju, te oksidativna DNA oštećenja u fetalnoj cirkulaciji.⁴⁸⁻⁵⁰ Votavova i sur.⁴² komparativno analizajući placentarne profile nakon microarray analize, otkrili su deregulaciju 158 gena izlaganjem posteljice aktivnom pušenju, ali i 5 gena kod izlaganja pasivnom pušenju, dok je prethodnim istraživanjem Votavova detektirala deregulaciju 49 gena krvi pupkovine.^{40,42} Radi se o cijeloj lepezi bioloških procesa na razini posteljice poput regulacije stanične proliferacije, koagulacije, hemostaze, regulacije razine tjelesnih tekućina, regulacija produkcije kemokina, diobe DNA, morfogeneze embrionalnih organa, regulacije stanične smrti, kataboličkih procesa masnih kiselina, homeostaza staničnih iona, ili na razini krvi pupkovine poput obrambenog odgovora na infekciju bakterijama, transporta klorida, regulacije rasta, transporta anorganskih aniona, signalnih puteva neuropeptida isl.⁴¹

Slatter i sur. opisuju kako je u posteljica majki koje puše ne samo značajno povećana učestalost prekida dvostruke uzvojnice DNA (eng. double-strand DNA break) u odnosu na kontrolnu skupinu, nego već tako oštećeni sincicij prati i oštećeni mehanizam popravka DNA (eng. DNA repair response) i defektna proteinska ekspresija.⁴⁴ Međutim napredak u popravku DNA postiže se već prekidom pušenja tijekom trudnoće, pa čak ako ono nastupi kasno u trudnoći.⁴⁴ Suter i sur. prikazali su kako se zbog izloženosti duhanskom dimu značajno mijenja izražajnost čak 623 gena u posteljici majke koja puši, dok se oko 10% razlikuje na metilacijskoj razini. Promijenjena placentarna metilacija na svega šest mjesta se može povezati sa značajnom redukcijom promjene novorođenačke težine pri rođenju.⁴⁵ Varesch i sur. dodaju kako upravo interakcija prenatalnog pušenja i DNA-metilacija gena odgovornih za upalni odgovor (interleukin 13) utječe na reaktivnost respiratornog epitela odnosno da je opisani događaj pozadina razloga za učestalije s astmom povezane respiratorne bolesti djece u majki koje puše.⁴⁶ Možda jedan od najzanimljivijih radova je istraživanje Lin i sur. koji su pokazali kako je duljina placentarnih telomera u negativnoj korelaciji s koncentracijom kadmija u posteljici.⁴⁷

S obzirom na prethodno navedeno ne začuđuju rezultati posljednjeg vala epidemioloških istraživanja s dugogodišnjim praćenjem djece čije majke su pušile tijekom trudnoće. Ne samo da se izlaganje fetusa duhanskom dimu bilo kroz pušenje majke ili partnera i ukućana tijekom trudnoće povezuje sa značajnim smanjenjem porođajne težine i opsega glavice, nego ima za posljedicu utjecaj na reproduktivno zdravlje djece što se očituje kroz niz parametara: ubrzan razvoj sekundarnih spolnih osobina tijekom puberteta, redukciju ukupnog broja spermija u muškaraca čiji očevi ili očevi i majke su pušili tijekom intrauterinog razdoblja, te redukciju proliferacije germinativnih stanica u fetalnom ovariju.⁴⁸⁻⁵³ Zanimljivo je također da pušenje majke tijekom intrauterinog razvoja utječe i na konačnu maksimalnu dosegnutu visinu rasta u muškaraca, te na povećani BMI u odrasloj dobi u odnosu na kontrolnu skupinu.⁵⁴

Možda najslikovitiji prikaz utjecaja nikotina na fetus daje rad Ejaz i sur. koji su pratili pokrete glavice, repa te cijelog tijela pilećeg fetusa, a s obzirom na različite doze iniciranog nikotina. Pokazalo se kako niske doze induciraju hiperaktivnost dok visoke potiču hipoaktivnost. Drugim riječima dokazali su o dozi ovisno smanjenje normalnih kretnji embrija nužnih za pravilan embrionalni razvoj fetusa. Što je doza bila veća,

razdoblje hipoaktivnosti nastupilo je brže, trajalo duže, dok je vrijeme potrebno za oporavak normalnih kretnji bilo duže, ili oporavak nije niti nastupio.⁵⁵

1.6. Značenje imunohistokemijske analize uteroplacentarne membrane

Analiza uteroplacentarne membrane poprima pravo značenje tek uklapanjem u cijeli uzročno-poslijedični slijed zbivanja potaknutih sastojcima duhanskog dima. Davanjem značenja svakoj kockici istraživačkog mozaika, te uspoređivanjem i određivanjem statistički značajne razlike između skupina, a potom detektiranjem povezanosti kroz utvrđivanje korelacije između antropometrijsko-epidemioloških podataka majke, kliničkih podataka o tijeku trudnoće i porođaja, makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika posteljice odnosno stanja uteroplacentarne membrane, izražajnosti imunohistokemijskih markera, te naposljetku antropometrijskih karakteristika novorođenčeta, pokušalo se sagledati posljedice izloženosti majke, posteljice i fetusa duhanskom dimu, te utvrditi njihovi međusobni odnosi.

Posteljica je tumoru nalik organ u kojem se događa proliferacija, migracija i invazija. Naime ekstravilozne trofoblastične stanice migriraju i invadiraju stijenku maternice i njezin krvožilni sustav da bi omogućile životnu vezu između majke i fetusa zahvaljujući biokemijskim mehanizmima koji omogućuju trajnu proliferaciju tijekom gestacije.^{56,57} Posteljica u sebi samoj kombinira jedinstvenu sposobnost stvaranja različitih proteina, peptida, steroidnih hormona, no isprepletena s ovim procesima je nevjerojatna sposobnost istovremenog reguliranja njihove sinteze i sekrecije.⁵⁸ Zbog toga posteljica predstavlja autonomnu ili samodostatnu jedinicu sposobnu modulirati vlastiti rast i funkciju, istovremeno pomažući razvoj fetusa dok nije sposoban neovisno živjeti.⁵⁹

U ovom kontekstu p53 je osobito zanimljiv, jer kao čuvar genoma pokreće apoptozu ne samo u slučajevima mutacija DNA, već zaustavljajući stanični ciklus kaskadom kaspaza, koje pokreću apoptotske mehanizme u posteljici, regulira njezin rast. Kako p53 zapravo predstavlja sam vrh pokretačke piramide, reagira također na različite utjecaje koji se mogu staviti pod zajednički nazivnik toksičnog učinka na posteljicu. Drugim riječima, svaki poremećaj homeostaze u posteljici na neki način bi trebao biti

evidentiran promjenom ekspresije p53. Mišljenje je autora kako je najvjerojatnije imunohistokemijski detektibilna ekspresija p53 proteina u trofoblastu posljedica povratne sprege (eng. up-regulation) p53 tumor supresorskog gena, što bi mogao biti mehanizam kontrole trofoblastičke proliferacije.^{56,60,61} Jeschke je tako dokazao sniženu ekspresiju p53 u posteljicama djece s intrauterinim zastojem rasta.⁶² Drugim riječima iz navedenih radova se ne može razlučiti radi li se o ekspresiji divljeg ili mutiranog oblika p53. Postoji li zaista mutacija p53 u posteljici izazvana sastojcima duhanskog dima, moguće je imunohistokemijski utvrditi jedino odabirom specifičnog klona koji reagira s mutantima, ali ne i s divljim tipom p53. Izražajnost p53 u posteljici vidljiva je jedino u citotrofoblastu, ali ne i sinciciotrofoblastu, pa bi tako p53 mogao biti indikatorom proliferacijske aktivnosti.⁶³ Shvatljivo je stoga da se DNA abnormalnosti mogu lako dogoditi u aktivno proliferirajućim stanicama, kao što su citotrofoblastične stanice, prije nego u diferenciranijim sinciciotrofoblastičnim stanicama.⁶⁴

p53 i bcl-2 igraju ključnu ulogu u apoptozi. Stanično samoubojstvo odnosno programirana stanična smrt tijekom koje se jezgra kondenzira i fragmentira, smatra se najvažnijim mehanizmom stanične smrti u ljudi.⁶⁵ Karakteristično za zdrava tkiva jest da je ekspresija divljeg tipa p53 u obrnutom odnosu s bcl-2, te da se viđa u tkivima karakteriziranim pojavom apoptoze. Stoga je osobito zanimljivo vidjeti izraženost ekspresije ovih markera u posteljici koja je pod utjecajem sastojaka cigaretnog dima, te kakav je odnos mutiranog p53 i bcl-2. Naime, bcl-2 se pokazao najboljim markerom apoptoze u posteljici.⁶⁶ Imunolokalizacija antiapoptoskog bcl-2 proteina isključivo je vidljiva u citoplazmi sinciciotrofoblasta tijekom trudnoće, ali ne i u citotrofoblastu, u sličnom obujmu u pretermijskih i terminskih posteljica. Autori smatraju kako je vjerojatno ekspresija bcl-2 u korionskim resicama jedan od glavnih čimbenika koji čuva ove strukture od rane stanične smrti.⁶⁷ Studije s posteljicama s intrauterinim zastojem rasta pokazuju pojačanu apoptozu sinciciocitotrofoblasta.⁶⁸ Tako je Qiao dokazao kako je izražajnost p53 u kompletnoj grozdastoj potajnici znatno viša nego u normalne posteljice, uz značajno nižu izraženost bcl-2, što pak može indicirati neoplastičniju prirodu trofoblasta u kompletnoj grozdastoj potajnici nego u normalnoj posteljici.⁶³

1.7. Uloga metalotioneina i HSP-70 u posteljnom tkivu

Pušenje za vrijeme trudnoće i dojenja, te kliničke implikacije koje iz toga proizlaze, izlaže zdravlje potomstva različitim rizicima, te je predmetom velike pozornosti.⁶⁹ Metali, osobito kadmij (Cd), posebice se ispituju zbog utjecaja na fetalni razvoj. Jedna cigareta sadrži 1-2µg kadmija, dok 20 popušanih cigareta dnevno pridonosi inhalaciji dodatnih 2-4µg kadmija.^{70,71} Kadmij utječe na metabolizam esencijalnih mikroelemenata kao što su bakar (Cu), željezo (Fe), magnezij (Mg), selen (Se), te cink (Zn), čija specifična razina je ključna za normalni razvoj fetusa i novorođenčeta.⁷² Jedan od glavnih proteina koji veže kadmij je metalotionein. To je niskomolekularni protein (7-10kDa), koji je bogat sulfhidrilnim reziduama i sposoban vezati bivalentne metale kao što su kadmij i cink.⁷³

Glavna funkcija metalotioneina je sudjelovanje u metabolizmu esencijalnih metala cinka i bakra, te zaštita od efekata teških metala odnosno kadmija i žive⁷⁴, uključivanjem u antioksidativne procese u stanici.⁷⁵ Smatra se kako metalotionein sekvstrira teške metale kao što je kadmij, te stvara kompleks s kadmijem (Cd-MT) koji i sam može biti toksičan.⁷³

Zanimljivo je da je Milnerowicz istražujući utjecaj pušenja na majčino mlijeko tijekom dojenja došla do podataka kako pušenje nije utjecalo na razinu laktoferina i albumina odnosno proteina u mlijeku koji također vežu metale, već samo na razinu metalotioneina, koja je u majki koje su pušile bila dvostruko niža, dok je razina kadmija bila četiri puta viša.⁶⁹ Pad metalotioneina objašnjava se upravo stvaranjem kompleksa MT-Cd i zaštitnim mehanizmom metalotioneina.⁶⁹ Međutim kadmij provocira *de novo* sintezu metalotioneina u posteljici, što je osobito važno. Naime, cink je kao esencijalni mikronutrijent nužan za fetalni rast i razvoj, te funkciju imunološkog sustava, naglašavajući time izuzetnu važnost ravnoteže razine cinka tijekom trudnoće.⁷⁶ Dokazano je kako nadoknada cinka tijekom trudnoće zaista reducira novorođenački morbiditet u populacijama gdje je uobičajeni nedostatak cinka.⁷⁷ Tijekom fetalnog razvoja putem placente, a tijekom dojenja putem mlijeka, cink dopijeva do mladog organizma vezan za metalotionein. Smatra se kako upravo metalotionein održava homeostazu cinka u organizmu kontrolirajući stanično preuzimanje cinka, distribuciju i ekskreciju, te funkcionirajući kao kratkotrajno

skladište za taj metal.⁷⁸ Ronco i sur.⁷⁹ su u svojoj studiji dokazali porast razine kadmija i metalotioneina u placenti žena koje puše. Kadmij inducira sintezu metalotioneina, pa zbog visokog afiniteta prema metalotioneinu čini kompleks Cd-MT koji zapravo ima zaštitnu ulogu za fetus, jer se toksični kadmij zaustavlja na razini posteljice. Međutim posredni efekt leži u slijedećem: zbog povišene koncentracije slobodnog metalotioneina u posteljici, dodatno se vežu i veće količine cinka koji onda u manjim koncentracijama dopire do fetusa, pridonoseći uz ostale čimbenike duhanskog dima, ugljični monoksid prije svega, smanjenoj porođajnoj težini novorođenčeta.⁷⁹

HSP (eng. Heat shock protein) pripada obitelji bjelančevina koja se inicijalno opisuje uslijed molekularnih zbivanja izazvanih staničnom hipertermijom, međutim, povišena sinteza HSP-a kao posljedica stresa, a ne samo toplinskog šoka, poznata je gotovo trideset godina. No uloga HSP-a postala je jasnom tek unazad nekoliko godina. HSP se naziva molekularnim čuvarom (engl. molecular chaperon). Naime, tijekom sinteze bjelančevina i translokacije u različite intracelularne dijelove, nužno je privremeno postojanje bjelančevine u nerazvučenom ili djelomično razvučenom obliku. Prethodno skrivena područja, nakon postizanja linearne konformacije mogu reagirati. HSP štiti upravo ove interaktivne dijelove bjelančevina vežući se za njih i olakšavajući njihovo nabiranje sprječavajući tako fatalnu agregaciju proteina.⁸⁰

Geni odgovorni za sintezu HSP iznimno su otporni pod stresnim uvjetima.⁸¹ Nedavne studije pokazuje kako HSP igra ključnu ulogu ne samo u uvjetima staničnog stresa, već još češće pridonosi očuvanju stanične homeostaze, kao dio staničnog odgovora na egzogene čimbenike uključujući oksidante, ozljede, operacije i toksine.^{82,83} Studije koje ispituju HSP izraženost u posteljici se teže nalaze. Sotirou je potvrdio povišenu izraženost HSP-a u posteljicama plodova pobačenih tijekom prvoga trimestra gestacijske dobi.⁸⁴ Zanimljivi su rezultati Wu i sur.⁸⁵ koji su utvrdili porast HSP-70 i HSP-90 u miometriju i endometriju ovaca uoči poroda, zbog čega autori pretpostavljaju da je upravo moguća uloga HSP inhibirati progesteronsku, a stimulirati estrogensku funkciju u uterinom tkivu za vrijeme poroda. Na temelju svega navedenog pušenje bi trebalo povećati ekspresiju HSP u posteljici, pa jedan od mogućih medijatora prijevremenoga poroda i pobačaja bi mogao biti i HSP s poslijedičnim poremećajem ravnoteže progesteron/estrogen.⁸⁵

1.8. Znanstveni doprinos

U žarištu zanimanja ove studije bile su promjene uteroplacentarne membrane koje su proučavane na morfološkoj i imunohistokemijskoj razini izraženošću HSP-70, metalotioneina, p53 i bcl-2. Znanstveni doprinos istraživanja temelji se na kvalitativnoj i kvantitativnoj kategorizaciji patohistoloških i imunohistokemijskih značajki posteljica prezentiranih u obliku skalarnih indeksa uobličenih potom u **imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)** koji zajedno s **morfološkim indeksom posteljice (MIP)** sačinjava **indeks intoksikacije posteljice (IIP)**. S obzirom da obuhvaća promjene morfoloških i imunohistokemijskih značajki posteljice, IIP predstavlja procjenu težine intoksikacije posteljica izloženih aktivnom ili pasivnom pušenju odnosno kombinaciji tih dvaju oblika. Stoga bi IIP jasno i dugoročno mogao odgovoriti na pitanje o postojanju novorođenčadi koja su u povećanoj opasnosti od razvoja zdravstvenih poremećaja nastalih kao posljedica izlaganja trudnica duhanskom dimu.

2. HIPOTEZA

Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) je relevantan pokazatelj intenziteta toksičnih zbijanja u posteljici odnosno postoji uzročno-posljedična veza između izloženosti posteljice duhanskom dimu i razine intoksikacije posteljice.

3. CILJEVI RADA

- Utvrditi postoji li **statistički značajna povezanost** između ispitivanih skupina i navike pušenja s obzirom na komplikacije tijekom trudnoće i poroda, te antropometrijske vrijednosti novorođenčeta.
- Odrediti **skalarne indekse (SI) patohistoloških parametara** posteljica po ispitivanim skupinama i utvrditi postoji li statistički značajna povezanost s izlaganjem duhanskom dimu.
- Na temelju skalarnih indeksa (SI) patohistoloških parametara odrediti **morfološki indeks posteljice (MIP)** i utvrditi postoji li statistički značajna povezanost MIP s izlaganjem duhanskom dimu.
- Odrediti **skalarne indekse (SI) izražajnosti imunohistokemijskih markera** i utvrditi postoji li statistički značajna povezanost s izlaganjem duhanskom dimu.
- Na temelju skalarnih indeksa (SI) imunohistokemijskih markera odrediti **imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)** i utvrditi postoji li statistički značajna povezanost s izlaganjem duhanskom dimu.
- Zbrajanjem morfološkog indeksa posteljice (MIP) i imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP) odrediti **intoksikacijski indeks posteljice (IIP)** i utvrditi postoji li statistički značajna povezanost IIP s izlaganjem duhanskom dimu.
- Utvrditi postoji li **korelacija** između navike pušenja i komplikacija tijekom trudnoće i poroda, antropometrijskih vrijednosti novorođenčeta, morfoloških značajki posteljice, izražajnosti imunohistokemijskih markera te vrijednosti indeksa.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanice

U istraživanje je uključeno 290 roditelja iz Klinike za ženske bolesti i porode u Zagrebu i Opće bolnice „Dr Ivo Pedišić“ u Sisku.

Naime, za potrebe istraživanja anketirane su 953 roditelje iz Siska i Zagreba. S obzirom na u anketama naznačeni status pušenja, u istraživanje je nasumično uključeno 290 roditelja. Preduvjet za uključivanje roditelja u nastavak studije koji je obuhvatio analizu posteljica, bila je potpuna ispunjenost ankete. Roditelji nisu razdvajane po mjestu anketiranja, već su tretirane kao jedinstvena populacija koja je s obzirom na naviku pušenja raspoređena u četiri skupine ispitanica kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Raspored ispitanica po skupinama s obzirom na naviku pušenja roditelja, te njihovih partnera i ukućana.

Status s obzirom na naviku pušenja No:290	OP No:84	AP No:68	PP No: 64	KP No:74
roditelja	NE	DA	NE	DA
partner	NE	NE	DA	DA
ukućani	NE	NE	DA/NE	DA/NE

Legenda:

OP – skupina roditelja koje ne puše, niti puše njihovi partneri i/ili ukućani;

AP – skupina roditelja koje su aktivno pušile tijekom trudnoće, ali nisu bile izložene pasivnom pušenju;

PP – skupina roditelja koje su tijekom trudnoće bile izložene pasivnom pušenju;

KP – skupina roditelja koje su tijekom trudnoće bile izložene aktivnom i pasivnom pušenju.

4.2. Metode

4.2.1. Arhiviranje podataka

Za svaku ispitanicu pripremljen je arhivirani podlistak koji se dostavlja u privitku, s rednim brojem koji u daljnjem istraživanju zamjenjuje ime roditelja pri unosu podataka u bazu, što je omogućilo očuvanje anonimnosti svake ispitanice. Arhivirani podlistak sastoji se od tri dijela :

Podlistak A sastoji se iz ankete koju je svaka roditeljica samostalno ispunila nakon što je vlastoručnim potpisom potvrdila svojevoljno sudjelovanje u istraživanju. Anketa sadrži pitanja o osnovnim antropometrijskim podacima majke i oca, majčin osvrt na eventualne komplikacije tijekom trudnoće, te pitanja vezana uz epidemiološke podatke s naglaskom na naviku pušenja majke i oca.

Podlistak B je ispunjen uvidom u povijest bolesti radi prikupljanja podataka dobivenih kliničkim pregledom roditeljice i novorođenčeta, te praćenjem poroda.

Podlistak C je bio predviđen za upis podataka makroskopske i patohistološke analize posteljinih tkiva, te rezultata imunohistokemijske analize.

4.2.2. Morfološka analiza posteljice

Makroskopska morfološka obilježja:

Morfološki opis posteljice obuhvatio je veličinu, oblik, te prisutnost akutnih i kroničnih infarkta.

Morfološki opis pupkovine obuhvatio je dužinu, inserciju, čvorove, varikozitete.

Morfološki opis ovojnice obuhvatio je glatkoću, boju, debljinu, te prisutnost tragova mekonija.

Mikroskopska morfološka obilježja:

Za patohistološku analizu preuzeta su tri uzorka iz područja šireg središta posteljice. Uzorci su obrađeni standardnom histološkom metodom fiksiranja tkiva u 10% formalinu, te nakon uklapanja u parafinske blokove, rezani su na rezove debljine 4 µm i bojati H/E metodom.

Svjetlosnim mikroskopom analizirano je petnaest mikroskopskih morfoloških elemenata posteljice kao što je akutni i kronični infarkt, perivilozni i intervilozni fibrin, intervilozna tromboza, hematomi, kalcifikati, dok je osobita pozornost posvećena statusu korionskih resica (povećanje gustoće i razgranatosti, povećanje broja i promjera fetalnih kapilara) i statusu uteroplacentarne membrane (zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, fibroza strome resica, proliferacija citotrofoblasta, prisutnost sincicijskih čvorića, povećanje efektivne difuzijske udaljenosti).

4.2.3. Imunohistokemijska analiza

Za imunohistokemijsku analizu korišteni su:

p53

Kao pokazatelj izražajnosti p53 proteina korišteno je monoklonalno protutijelo (Monoclonal Mouse Anti-p53 Protein, Clone: PAb249, Isotype: OGG1, kappa; Dako) koje reagira s evolucijski očuvanim

epitopom p53 proteina, koji je izražen jedino na mutant-oblicima p53 proteina u kojima su strukturne mutacije promijenile konformaciju proteina.

HSP 70

Kao pokazatelj izražajnosti HSP 70 korišteno je poliklonalno protutijelo (Polyclonal Rabbit Anti-Heat Shock Protein 79; Dako) koje snažno križno reagira s dva glavna humana Heat shock proteina od 72 i 73 kDa. Većina živih stanica reagira na različite stresne uvjete kao što su povišena temperatura, infekcija i toksične kemikalije prolaznim povišenjem izražajnosti HSP-a.

Metalotionein

Kao pokazatelj izražajnosti metalotionein korišteno je monoklonalno protutijelo (Monoclonal Mouse Anti-Metallothionein, Clone: E9, Isotype: IgG1, kappa; Dako) koje reagira s konzerviranim epitopom koji dijele humane izoforme metalotioneina 1 i 2. Metalotionein su proteini niske molekularne težine koji vežu teške metale. Izražajnost metalotioneina je inducirana teškim metalima, ali također čimbenicima kao što su stres, glukokortikoidi i limfokini.

Bcl-2

Kao pokazatelj izražajnosti bcl-2 onkoproteina korišteno je monoklonalno protutijelo (Monoclonal Mouse Anti-Human Bcl-2 Oncoprotein, Clone:124, Isotype: IgG1, kappa; Dako) koje reagira s bcl-2 onkoproteinom kojega kodira gen uključen u t(14;18) kromosomsku translokaciju. Bcl-2 onkoprotein igra temeljnu ulogu u apoptozi igrajući ulogu inhibitora apoptoze, te je po njemu nazvana cijela obitelj proteina koje su uključene u pokretanje/inhibiciju apoptoze.

4.3. Metode statističke analize

Kvalitativne i semikvantitativne varijable su prikazane apsolutnim brojem i postotkom. Razlike između skupina testirane su **X²-testom**. U slučaju malih frekvencija bilo je potrebno grupirati odgovore.

Kvantitativne varijable prikazane su medijanom i pripadajućim rasponom. Zbog relativno malog uzorka primijenjeni su neparametrijski testovi. Razlike kvantitativnih varijabli testirane su **Kruskal-Wallis ANOVA** testom (između 4 skupine) i eventualno **Mann-Whitney U-testom** (između 2 skupina). Povezanost pojedinih kvantitativnih varijabli u svakoj skupini zasebno testirana je **Spearmanovom rang korelacijom**.

4.4. Određivanje pokazatelja intoksikacije posteljice duhanskim dimom

4.4.1. Morfološki indeks posteljice (MIP)

Za izračun morfološkog indeksa posteljice (MIP) odabrano je 15 patohistoloških elemenata posteljice koji su analizirani kvantitativno i kvalitativno.

Kvantitativni indeks (KNi) odražava **difuznost** izraženosti pojedine morfološke značajke, te ima vrijednosti:

- 0 – morfološka značajka nije izražena;
 - 1 – morfološka značajka izražena je u do 10% pregledane površine;
 - 2 - morfološka značajka izražena je 10% - 50% pregledane površine;
 - 3– morfološka značajka izražena je u više 50% pregledane površine.
- Prema tome morfološka značajka može postići KNi vrijednosti od 1 – 3.

Kvalitativni indeks (KVi) odražava **intenzitet** izraženosti pojedine morfološke značajke, te ima vrijednosti:

- 0 – morfološka značajka nije izražena;
 - 1 – morfološka značajka je slabo izražena odnosno semikvantitativnim mjerenjem iznosi (+)
 - 2 – morfološka značajka je umjereno izražena odnosno semikvantitativnim mjerenjem iznosi (++)
 - 3 – morfološka značajka je jako izražena odnosno semikvantitativnim mjerenjem iznosi (+++)
- Prema tome morfološka značajka može postići KVi vrijednosti od 1 – 3.

Skalarni indeks (SI) pojedine morfološke značajke odgovara zbroju **kvalitativnog indeksa (KVi)** i **kvantitativnog indeksa (KNi)** kao što je prikazano u Tablici 2. Prema tome SI svakog promatranog patohistološkog elementa mogao je imati vrijednosti od 2 do 6.

Tablica 2: Prikaz odnosa morfološkog indeksa posteljice (MIP) i skalarnih indeksa (SI) izraženosti mikrosopskih morfoloških značajki posteljice posteljice

Morfološki indeks posteljice (MIP) = $\sum SI$ (12 morfoloških značajki)	Skalarni indeks (SI) izraženosti morfološke značajke = Kvalitativni indeks (KVi) + Kvantitativni indeks (KNi)	
Niski: 0 - 24	Blaga izraženost: 2	Intenzitet : 1-3
Srednji: 25 - 48	Umjerena izraženost: 3,4	Difuznost : 1-3
Visoki: 49 – 72	Naglašena izraženost: 5,6	SI zbroj: 2-6

Radi postizanja veće kongruentnosti, rezultati skalarnih indeksa su se dodatno semikvantitativno analizirali na način da je SI odražavao **blagu** izraženost morfološke značajke ukoliko su skalarni vrijednosti bile 1 - 2, **umjerenu** izraženost morfološke značajke ukoliko su skalarni vrijednosti bile 3 - 4 ili **naglašenu** izraženost morfološke značajke ukoliko su skalarni vrijednosti bile 5 - 6. (Tablica 2.)

Zbrajanjem svih statistički značajnih skalarnih indeksa ispitivanih morfoloških značajki dobio se **morfološki indeks posteljice (MIP)**.

Naime, preduvjet za uključivanje pojedinog morfološkog elementa u izračun MIP bio je utvrđivanje statistički značajne povezanosti skalarnog indeksa date morfološke značajke s kategorijom pušenja kako u skalarnoj tako i u semikvantitativnoj analizi. Iz prethodnog proizlazi da broj skalarnih indeksa odnosno morfološke značajke koje su uključene u izračun MIP, nije bio unaprijed poznat. Stoga je u konačnici MIP izračunat zbrajanjem *dvanaest* statistički značajnih skalarnih indeksa histoloških parametara.

Zaključno, svaka posteljica je mogla postići niski, srednji ili visoki MIP: **niski** ukoliko je ukupni zbroj skalarnih indeksa od 0 – 24, **srednji** ukoliko je ukupni zbroj skalarnih indeksa 25 – 48 i **visoki** ukoliko je ukupni zbroj skalarnih indeksa 49 – 72.

Iz prethodnog proizlazi kako **MIP upućuje na nisku, srednju i visoku razinu intoksikacije posteljice promatranu kroz histološke elemente** odnosno odgovara takovoj težini morfoloških promjena posteljičnog tkiva izazvanih izlaganjem duhanskom dimu uslijed kojih **niski MIP** ukazuje na nisku intoksikaciju koja se manifestira blago izraženim morfološkim promjenama, **srednji MIP** ukazuje na

srednju intoksikaciju koja se manifestira umjereno izraženim morfološkim promjenama, te **visoki MIP** ukazuje na visoku intoksikaciju koja ima za posljedicu naglašene morfološke promjene posteljičnog tkiva.

4.4.2. Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)

Između ispitivanih markera, odabrani su Hsp70 i metalotionein radi ispitivanja kvantitativne i kvalitativne izražajnosti imunohistokemijske reakcije.

Kvantitativni indeks (KNi) odražava difuznost izraženosti imunohistokemijskog markera te ima vrijednosti:

- 0 – imunohistokemijska reakcija nije izražena;
- 1 – imunohistokemijska reakcija izražena je u manje od 10% pregledane površine;
- 2 – imunohistokemijska reakcija izražena je 10% - 50% pregledane površine;
- 3 – imunohistokemijska reakcija izražena je u više 50% pregledane površine.

Prema tome imunohistokemijska reakcija može postići KNi vrijednosti od 1 – 3.

Kvalitativni indeks (KVi) odražava intenzitet izraženosti pojedine morfološke značajke te ima vrijednosti:

- 0 – imunohistokemijska reakcija nije izražena;
- 1 – imunohistokemijska reakcija je slabo izražena odnosno semikvantitativnim mjerenjem iznosi (+)
- 2 – imunohistokemijska reakcija je umjereno izražena odnosno semikvantitativnim mjerenjem iznosi (++)
- 3 – imunohistokemijska reakcija je jako izražena odnosno semikvantitativnim mjerenjem iznosi (+++)

Prema tome morfološka značajka može postići KVi u vrijednosti od 1 – 3.

Skalarni indeks (SI) pojedinog imunohistokemijskog markera odgovara zbroju **kvalitativnog indeksa (KVi)** i **kvantitativnog indeksa (KNi)** kao što je prikazano u Tablici 3. Prema tome SI svakog promatranog imunohistokemijskog markera mogao je imati vrijednosti od 2 do 6.

Radi postizanja veće kongruentnosti, rezultati skalarnih indeksa su se dodatno semikvantitativno analizirali na način da je SI odražavao **blagu** izraženost imunohistokemijskog bojenja ukoliko su skalarne vrijednosti bile 1 - 2, **umjerenu** izraženost ukoliko su skalarne vrijednosti bile 3 - 4 ili

naglašenu izraženost imunohistokemijskog bojenja ukoliko su skalarni vrijednosti bile 5 - 6. (Tablica 3.)

Tablica 3. Prikaz odnosa imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP) i skalarnih indeksa (SI) izraženosti imunohistokemijskih markera (HSP-70 i metalotionein)

Imunohistokemijski indeks posteljice (IIP) = $\sum SI_{(HSP-70 \text{ i Metalotionein})}$	Skalarni indeks (SI) imunohistokemijskog markera = Kvalitativni indeks (KVi) + Kvantitativni indeks (KNI)	
Niski: 0-4	Blaga izraženost: 2	Difuznost - score: 1-3
Srednji: 5-8	Umjerena izraženost: 3,4	Intenzitet - score: 1-3
Visoki: 9-12	Naglašena izraženost: 5,6	SI : 2-6

Zbrajanjem svih statistički značajnih skalarnih indeksa imunohistokemijskih bojenja dobio se **imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)**.

Preduvjet za uključivanje pojedinog imunohistokemijskog markera u izračun IHIP bio je utvrđivanje statistički značajne povezanosti skalarnog indeksa date morfološke značajke s kategorijom pušenja kako u skalarnoj tako i u semikvantitativnoj analizi. Iz prethodnog proizlazi da broj skalarnih indeksa odnosno imunohistokemijski markeri koji su uključeni u izračun IHIP, nije bio unaprijed poznat. Stoga je u konačnici IHIP izračunat zbrajanjem dva statistički značajna skalarna indeksa imunohistokemijskih markera (HSP-70 i metalotionein).

Svaka posteljica mogla je postići niski, srednji ili visoki IHIP: **niski** ukoliko je ukupni zbroj skalarnih indeksa od 0 – 4, **srednji** ukoliko je ukupni zbroj skalarnih indeksa 5 – 8 i **visoki** ukoliko je ukupni zbroj skalarnih indeksa 9 – 12.

Iz prethodnog proizlazi kako **IHIP upućuje na nisku, srednju i visoku razinu intoksikacije posteljice promatranu kroz imunohistokemijske elemente** (Tablica 2).

Iz prethodnog proizlazi da je IHIP zapravo indeks koji odgovara rasponu imunohistokemijskim metodama utvrdivim promjenama strukture posteljice izazvanih izlaganjem duhanskom dimu. Stoga **niski IHIP** ukazuje na nisku intoksikaciju koja se manifestira blagom imunohistokemijskom

izražajnošću, **srednji IHIP** ukazuje na srednju intoksikaciju koja se manifestira umjerenom imunohistokemijskom izražajnošću, dok **visoki IHIP** ukazuje na visoku intoksikaciju koja se manifestira naglašenom imunohistokemijskom izražajnošću markera (Tablica 3).

4.2.3. Intoksikacijski indeks posteljice (IIP)

Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) predstavlja zbroj **morfološkog indeksa posteljice (MIP)** i **imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP)**.

S obzirom na postignute vrijednosti, IIP može biti **niski** ako je rezultat zbroja MIP i IHIP 0 - 30, **srednji** ako je rezultat 31 – 60 i **visoki** ako je 61 – 80.

Iz prethodnog proizlazi kako niski, srednji ili visoki IIP upućuje na nisku, srednju i visoku razinu intoksikacije posteljice (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz gradacije intoksikacijskog indeksa posteljice (IIP).

<p style="text-align: center;">Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) = Morfološki indeks posteljice (MIP) + Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)</p>	
Niski: 0 - 30	
Srednji: 31 -60	
Visoki: 61-80	

5. REZULTATI

5.1. Opći podaci

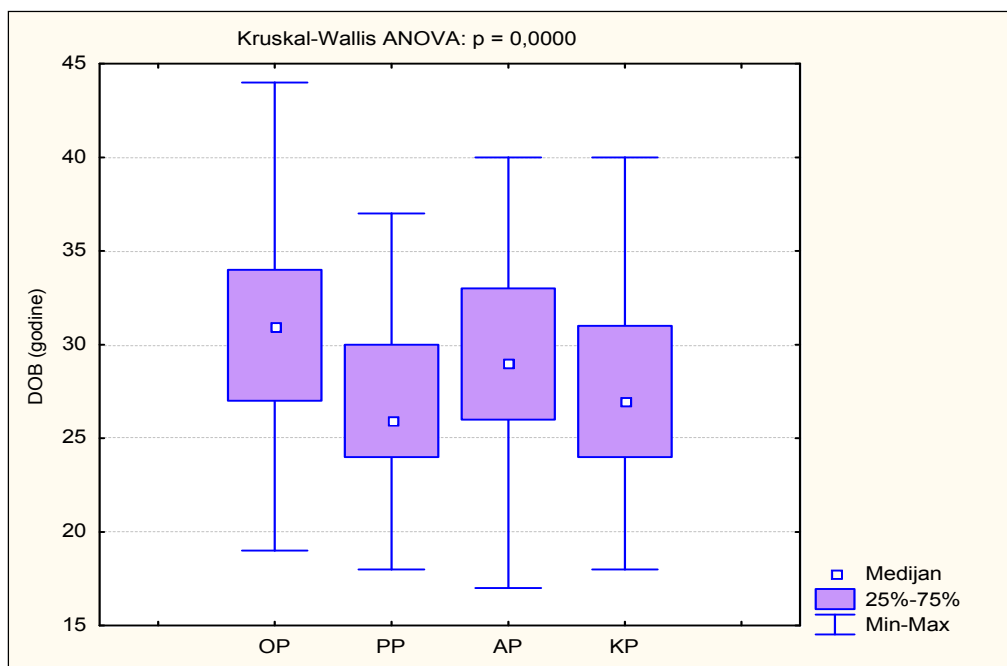
Kategorija pušenja pokazuje statistički značajnu povezanost skupina s dobi ispitanica, stručnom spremom, te brojem članova obitelji, dok se po ispitivanim skupinama ta povezanost ne vidi u svezi s bračnim stanjem, zaposlenošću, brojem djece ili krvnom grupom (Tablica 5).

Tablica 5. Socijalno-ekonomski status ispitanica po skupinama OP, PP, AP i KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p
Broj	84	67	70	76	
DOB					
	31 (19 – 44)	26 (18 – 37)	29 (17 – 40)	27 (18 – 40)	0,0000
STRUČNA SPREMA					
nss	5 (5,9%)	4 (6,3%)	4 (5,9%)	10 (13,5%)	0,0001
sss	44 (52,4%)	50 (78,1%)	48 (70,6%)	57 (77,0%)	
vss	35 (41,7%)	10 (15,6%)	16 (23,5%)	7 (9,5%)	
ZAPOSLENOST					
da	61 (73,5%)	40 (61,5%)	49 (71,0%)	40 (52,7%)	0,1062
ne	17 (20,5%)	21 (32,3%)	17 (24,6%)	27 (35,5%)	
student/domaćica	5 (6,0%)	4 (6,2%)	3 (4,4%)	9 (11,8%)	
BRAČNO STANJE					
udata	76 (90,5%)	51 (81,0%)	55 (84,6%)	61 (81,3%)	0,3213
neudata	8 (9,5%)	12 (19,0%)	10 (15,4%)	14 (18,7%)	
BROJ DJECE					
	1 (1 – 8)	1 (0 – 4)	0 (0 – 3)	1 (0 – 4)	0,1501
BROJ ČLANOVA OBITELJI					
	3 (1 – 11)	4 (2 – 8)	3 (1 – 6)	4 (1 – 13)	0,0002
KRVNA GRUPA					
A	38 (45,8%)	27 (42,9%)	28 (40,0%)	30 (39,5%)	0,6258
B	16 (19,3%)	12 (19,0%)	7 (10,0%)	11 (14,5%)	
AB	7 (8,4%)	3 (4,8%)	6 (8,6%)	8 (10,5%)	
0	22 (26,5%)	21 (33,3%)	29 (41,4%)	27 (35,5%)	

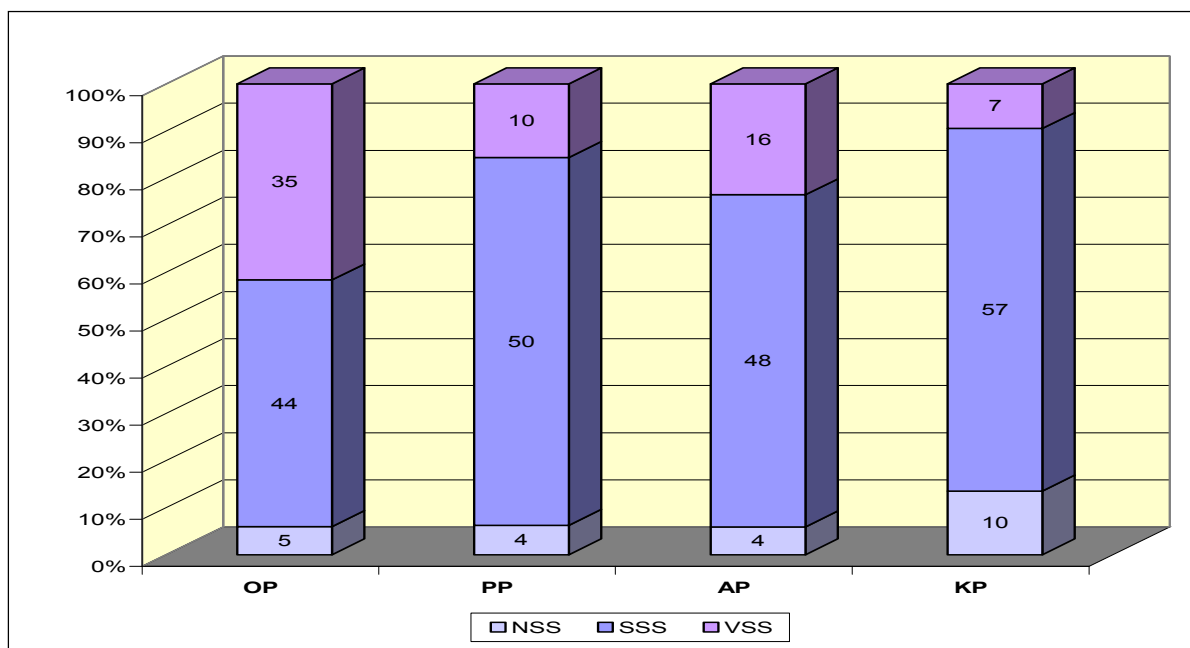
Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

Raspon dobi roditelja po skupinama s izraženim medijanom prikazan je na slici 1. Razvidno je kako se raspon dobi u populaciji roditelja kreće od 17 godina (roditelje iz skupine AP), pa do 44 godine (roditelje iz skupine OP), pri čemu se medijan dobi kreće od 26 godina za skupinu PP do 31 godine za skupinu OP. Iz ovakvog prikaza proizlazi da se najmlađa skupina roditelja nalazi u skupini PP, a zatim ju slijede skupine KP i AP dok su neosporno najstarije roditelje u skupini OP, a što pokazuje statistički značajnu povezanost ($p = 0,0000$) s kategorijom pušenja.



Slika 1. Dob pacijentica po pušačkim kategorijama.

Iako je većina roditelja u svim ispitivanim skupinama srednje stručne спре (SSS), kategorija pušenja ipak pokazuje statistički značajnu povezanost ($p=0,0001$) sa stupnjem obrazovanja na način da se najveći postotak visoko obrazovanih ispitanica nalazi u skupini OP ili 41,7% ispitanica skupine OP, dok se najveći udio nisko obrazovanih i nepismenih roditelja nalazi u skupini KP ili 13,5% ispitanica skupine KP. Drugim riječima, istraživanjem se iskristalizirala skupina s najslabije obrazovanom populacijom roditelja (skupina KP) i skupina s najobrazovanijim roditeljima (skupina OP) pri čemu je broj nisko obrazovanih roditelja u skupini OP gotovo izjednačen s brojem visoko obrazovanih roditelja u skupini KP (Slika 2).



Slika 2. Stručna sprema pacijentica po pušačkim kategorijama; χ^2 -kvadrat test: $p = 0,0001$

Broj članova obitelji pokazao je statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja ($p=0,0002$) iako na prvi pogled podatak kako roditelje većinom žive u tročlanim ili četveročlanim obiteljima ne odaje takovu povezanost. Međutim raspon broja članova obitelji varira od 1 do 13 u ovisnosti o skupini.

5.2. Fertilne značajke ispitanica

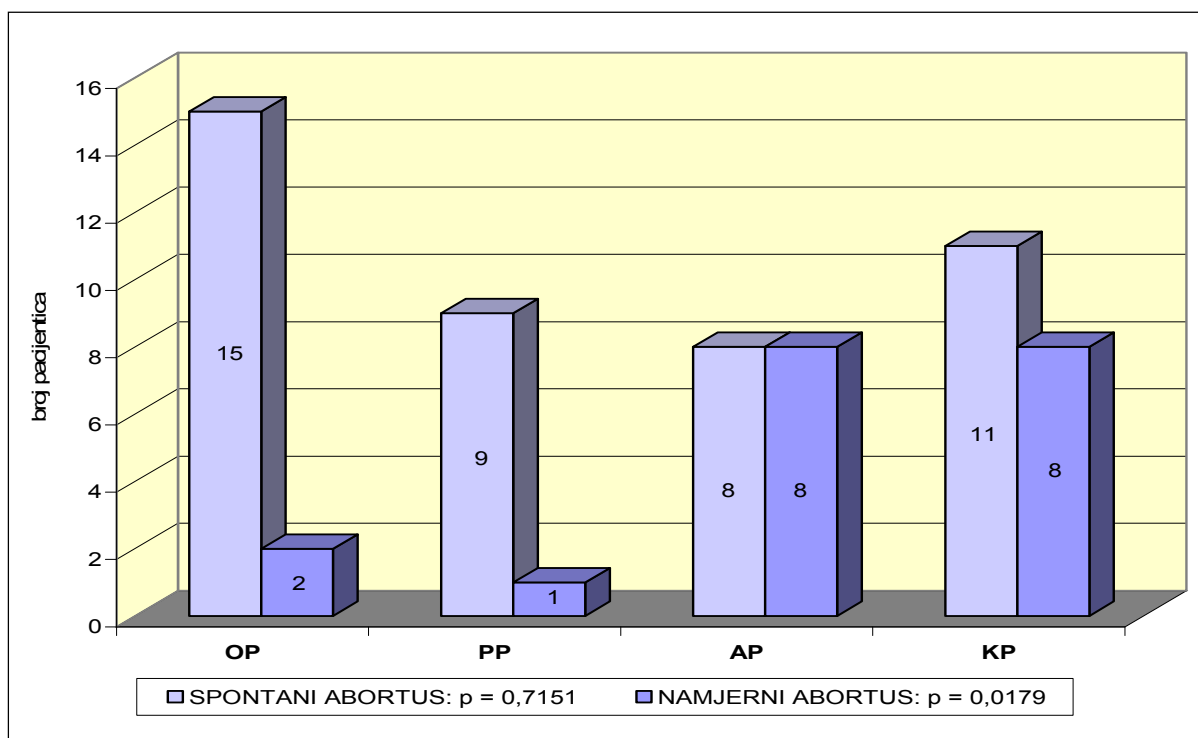
Kategorija pušenja pokazala je statistički značajnu povezanost s učestalošću namjernih pobačaja i problema začeca, dok se ista nije pokazala značajno vezanom uz učestalost spontanijih pobačaja i problema očuvanja trudnoće po ispitivanim skupinama (Tablica 6).

Tablica 6. Status prethodnih trudnoća ispitivanih skupina roditelja: OP, PP, AP, KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p
spontani pobačaj	15 (17,9%)	9 (13,4%)	8 (11,4%)	11 (14,5%)	0,7151
namjerni pobačaj	2 (2,4%)	1 (1,5%)	8 (11,4%)	8 (10,5%)	0,0179
problemi očuvanja trudnoće	12 (14,3%)	4 (6,1%)	10 (14,5%)	6 (8,0%)	0,2452
problemi začeca	7 (8,3%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0,0099

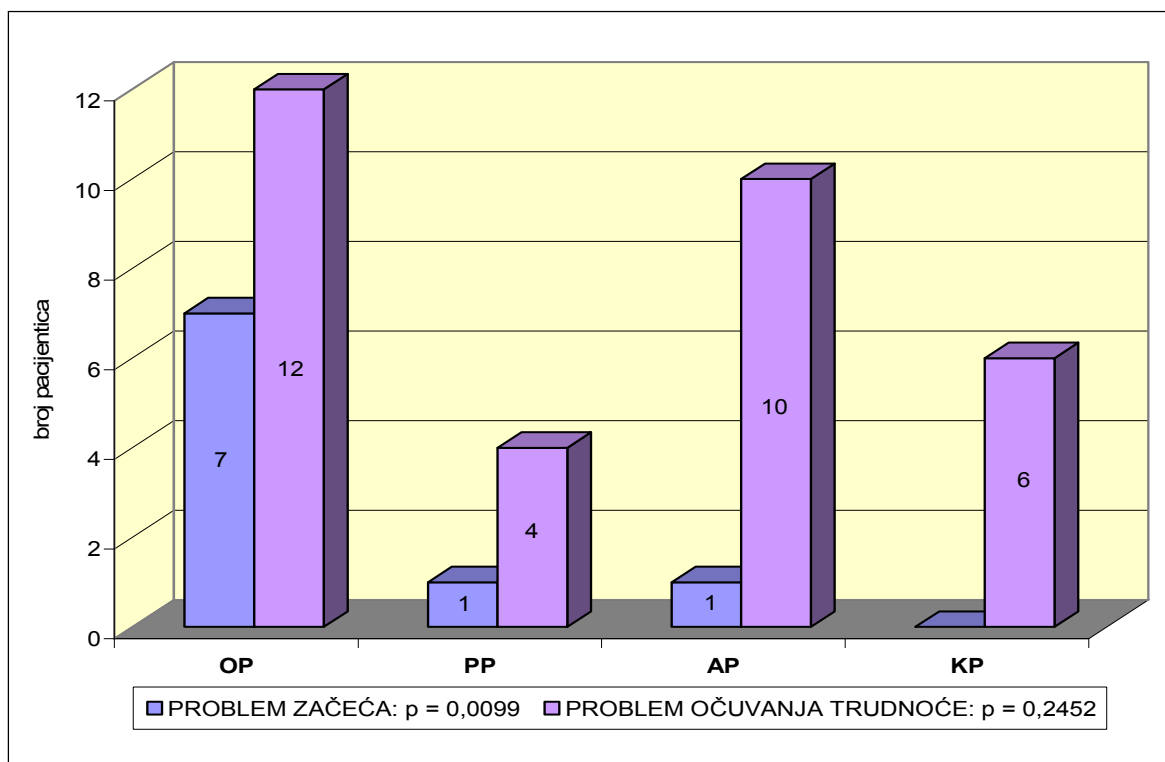
Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

Kao metodu planiranja obitelji s najvećom učestalošću namjerne pobačaje navode skupine AP i KP s 11,4% i 10,5% roditelja, dok ih najrjeđe kao metodu planiranja obitelji primijenjuje skupina PP i OP s 1,5% i 2,4% učestalosti. Drugim riječima postoji statistički značajna povezanost pušenja s odabirom namjernih pobačaja kao metode planiranja obitelji ($p=0,0179$) u skupinama AP i KP (Tablica 6). Na slici 3. prikazani su odnosi učestalosti spontanih i namjernih pobačaja po skupinama.



Slika 3. Spontani i namjerni pobačaji obzirom na pušačku kategoriju ispitanica.

S problemom začeća prethodnih trudnoća suočilo se 8,3% roditelja iz skupine OP, dok niti jedna roditelja iz skupine KP te svega 1,5% roditelja u skupinama PP i AP, što ujedno čini statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja. Drugim riječima problemi začeća značajno se češće javljaju u ispitanica skupine OP u odnosu na sve ostale skupine. Na slici 4. prikazana je učestalost problema začeća i očuvanja trudnoće po skupinama.



Slika 4. Problem začeća i očuvanja trudnoće obzirom na pušačku kategoriju ispitanica.

5.3. Zdravstveno stanje roditelja

Rodilje svih skupina iskazuju većinom dobro zdravstveno stanje prije i za vrijeme sadašnje trudnoće bez statistički značajne povezanosti s kategorijom pušenja (Tablica 7).

Tablica 7. Subjektivni dojam ispitanica o zdravstvenom stanju prije i za vrijeme sadašnje trudnoće, promatrano po skupinama OP, PP, AP i KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p
ZDRAVSTVENO STANJE PRIJE SADAŠNJE TRUDNOĆE					
dobro	77 (91,7%)	61 (91,0%)	62 (88,6%)	64 (85,3%)	0,5811
loše	7 (8,3%)	6 (9,0%)	8 (11,4%)	11 (14,7%)	
ZDRAVSTVENO STANJE ZA VRIJEME SADAŠNJE TRUDNOĆE					
dobro	69 (82,1%)	50 (75,8%)	60 (85,7%)	59 (78,7%)	0,4800
loše	15 (17,9%)	16 (24,2%)	10 (14,3%)	16 (21,3%)	

Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

5.4. Životne navike

Niti jedno pitanje iz skupine životnih navika, a odnosilo se na konzumiranje alkohola, lijekova, vitamina, željeza, kalcija, vrste prehrambenih namirnica, broja dnevnih obroka, pa i bavljenja sportom tijekom trudnoće, nije polučilo statistički značajnu razliku među ispitivanim skupinama (Tablica 8).

Tablica 8. Životne navike ispitanica promatrane po skupinama OP, PP, AP i KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p*
ALKOHOL	3 (3,6%)	2 (3,0%)	4 (5,7%)	4 (5,4%)	0,8273
LIJEKOVI	38 (45,8%)	30 (44,8%)	34 (48,6%)	37 (50,0%)	0,9168
VITAMINI	60 (71,4%)	41 (65,1%)	50 (71,4%)	42 (56,0%)	0,1451
ŽELJEZO	45 (53,6%)	32 (50,8%)	32 (47,1%)	30 (39,5%)	0,3241
KALCIJ	36 (43,4%)	31,8%)	32 (46,4%)	22 (31,4%)	0,1494
PREHRANA					
veg-makro-dijeta**	3 (3,6%)	3 (4,7%)	2 (2,9%)	2 (2,7%)	0,4349
voće	14 (16,7%)	15 (23,4%)	15 (21,7%)	8 (10,7%)	
povrće	13 (15,5%)	12 (18,8%)	15 (21,7%)	17 (22,7%)	
meso	14 (16,7%)	12 (18,8%)	15 (21,7%)	17 (22,7%)	
tijesto	9 (10,7%)	7 (10,9%)	1 (1,4%)	10 (13,3%)	
Kombinirano***	31 (36,9%)	15 (23,4%)	21 (30,4%)	21 (28,0%)	
BROJ OBROKA					
1 – 2	3 (3,6%)	7 (11,3%)	3 (4,4%)	1 (1,4%)	0,2046
3	34 (41,0%)	23 (37,1%)	27 (39,7%)	30 (41,1%)	
4	29 (34,9%)	24 (38,7%)	21 (30,9%)	22 (30,1%)	
5	17 (20,5%)	8 (12,9%)	17 (25,0%)	20 (27,4%)	
BAVLJENJE SPORTOM					
ne	61 (72,6%)	40 (61,5%)	49 (72,1%)	60 (81,1%)	0,0861
da	23 (27,4%)	25 (38,5%)	19 (27,9%)	14 (18,9%)	

Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

** - vegetarijanska i /ili makrobiotička dijeta/prehrana

5.5. Nadzor trudnoće

Praćenje trudnoće od strane bolničkog ginekologa, ginekologa u PZZ, privatnog ginekologa ili kombinacijom istih nije pokazalo statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja (Tablica 9).

Zaključiti se ipak može kako je većina ispitanica u svakoj skupini trudnoću kontrolirala kod svog ginekologa iz primarne zdravstvene zaštite. Kombinirano praćenje što uključuje i bolničkog ginekologa, u najvećem postotku su iskazale rodilje iz skupine AP, te OP.

Tablica 9. Nadzor trudnoće po skupinama OP, AP, PP, KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p
bolnički ginekolog	19 (22,6%)	16 (24,6%)	12 (17,6%)	11 (14,7%)	0,5074
ginekolog PZZ.	40 (47,6%)	35 (53,8%)	32 (47,1%)	41 (54,7%)	
privatni ginekolog	15 (17,9%)	8 (12,3%)	11 (16,2%)	16 (21,3%)	
kombinacija	10 (11,9%)	6 (9,2%)	13 (19,1%)	7 (9,3%)	

Legenda: OP – rodilja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – rodilja ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – rodilja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – rodilja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

5.6. Informacije u medijima o štetnosti pušenja

Mišljenja ispitanica o dostupnosti informacije o štetnosti pušenja u medijima pokazuju statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja, a što je vidljivo u tablici 10.

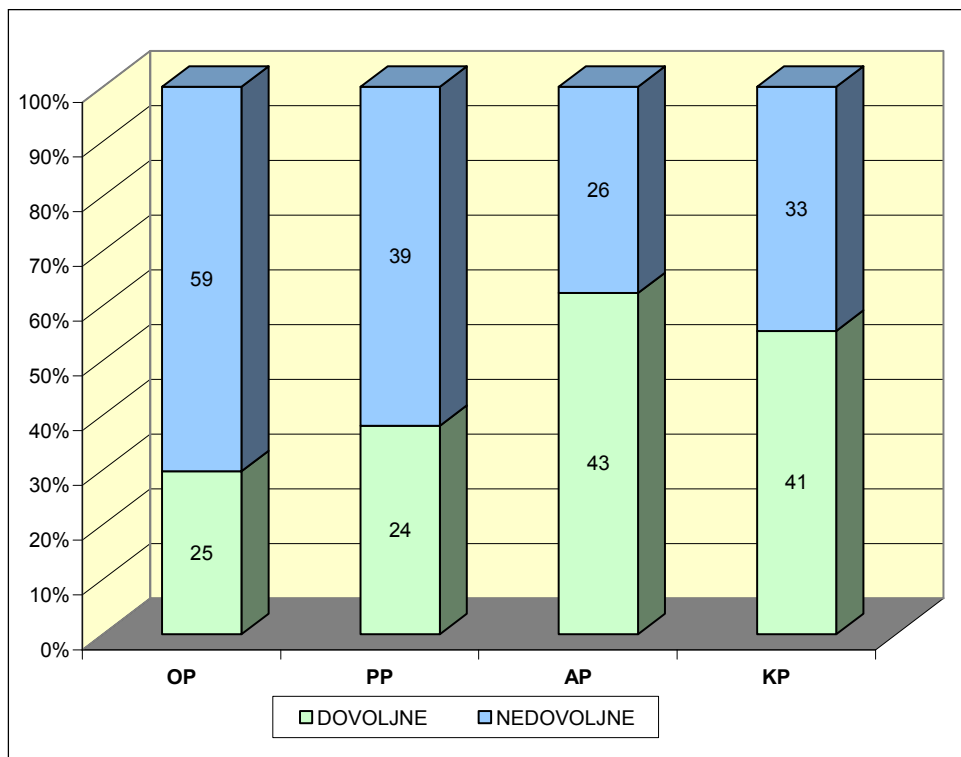
Tablica 10. Dostupnost informacija o štetnosti pušenja u medijima po skupinama OP, PP, AP i KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p
dovoljne	25 (29,8%)	24 (38,1%)	43 (62,3%)	41 (55,4%)	0,0001
nedovoljne	59 (70,2%)	39 (61,9%)	26 (37,7%)	33 (44,6%)	

Legenda: OP – rodilja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – rodilja ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – rodilja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – rodilja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

Naime, da informacija o štetnosti pušenja u trudnoći nema dovoljno misli većina rodilja iz skupine OP ili 70,2%, prate ih rodilje iz skupine PP (61,9%), međutim većina rodilja iz skupine AP i KP drži da informacija ima dovoljno (62,3%) odnosno

55,4%). Drugim riječima pozitivan, ali i negativan stav ispitanica pokazuje statistički značajnu povezanost (0,0001) s kategorijom pušenja (Slika 5).



Slika 5. Informacije o štetnosti pušenja u medijima; Hi-kvadrat test: $p = 0,0001$.

5.7. Edukacija o štetnosti pušenja od strane ginekologa

Educiranost roditelja o štetnosti pušenja pokazala je statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja s $p=0,0006$ što znači da je većina ispitanica skupine KP ili njih 77,3% educirana od strane svog ginekologa, za razliku ispitanica skupine OP koje edukaciju iskazuju u svega 48,6% (Tablica 11).

Tablica 11. Provođenje edukacije o štetnosti pušenja u trudnoći od strane vlastitog ginekologa po skupinama OP, PP, AP i KP.

Ispitanice	OP	PP	AP	KP	p
educirane roditelje	41 (48,8%)	35 (56,4%)	50 (71,4%)	58 (77,3%)	0,0006

Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

5.8. Novorođenački pokazatelji

Kategorija pušenja nije pokazala statistički značajnu povezanost s neonatološkim elementima prikazanim u tablici 12.

Tablica 12. Novenački pokazatelji po skupinama OP, PP, AP i KP

Ispitanici	OP	PP	AP	KP	p*
Broj ispitanica	84	67	70	76	
NAČIN PORODA					
vaginalno	75 (90,4%)	58 (86,6%)	55 (79,7%)	67 (88,2%)	0,2672
s.c.	8 (9,6%)	9 (13,4%)	14 (20,3%)	9 (11,84%)	
POROĐAJNI STAV					
glavica	79 (98,8%)	62 (96,9%)	60 (93,8%)	70 (93,3%)	0,2979
ostalo	1 (1,2%)	2 (3,1%)	4 (6,2%)	5 (6,7%)	
LIJEKOVI	50 (60,2%)	39 (59,1%)	35 (50,7%)	43 (56,6%)	0,6637
KOMPL. PORODA	6 (7,2%)	6 (9,1%)	11 (15,9%)	11 (14,5%)	0,2790
KOMPL. BABINJA	3 (3,6%)	1 (1,5%)	3 (4,4%)	1 (1,3%)	0,5999
SPOL DJETETA					
muški	53 (63,9%)	37 (55,2%)	38 (55,1%)	46 (60,5%)	0,6332
ženski	30 (36,1%)	30 (44,8%)	31 (44,9%)	30 (19,5%)	
GEST. DOB (tj)	39,7 (37,1 – 42,0)	40,0 (38,0 – 42,3)	40,0 (37,4 – 42,3)	40,0 (38,0 – 41,9)	0,3572
DUŽINA (cm)	51 (46 – 55)	51 (46 – 54)	51 (46 – 54)	51 (44 – 54)	0,1358
TEŽINA (g)	3500 (2730 – 4550)	3580 (2620 – 4640)	3390 (2520 – 4380)	3455 (2250 – 4850)	0,1922
PI	2,64 (2,17 – 3,17)	2,70 (2,28 – 3,44)	2,64 (2,16 – 3,14)	2,65 (2,14 – 3,17)	0,3689
BMI	13,53 (11,32 – 16,15)	13,74 (11,37 – 17,57)	13,20 (11,00 – 16,03)	13,28 (10,29 – 16,63)	0,3192
APGAR 1 = 10	76 (91,6%)	64 (95,5%)	58 (84,1%)	71 (93,4%)	0,0930
APGAR 5 = 10	81 (97,6%)	66 (98,5%)	66 (95,6%)	76 (100,0%)	0,3094
APGAR 1 i 5 =10	76 (91,6%)	64 (95,5%)	58 (84,1%)	71 (93,4%)	0,0930

Legenda: OP – roditelj, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelj ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelj puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelj, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

PI – placentarni index

BMI – body mass index

KOMPL. PORODA – komplikacije poroda

KOMPL. BABINJA – komplikacije babinja

5.3. Makroskopska analiza posteljica

Ispitivane makroskopske značajke posteljice, ovoja i pupkovine prikazane su u tablici 13. Kategorija pušenja nije pokazala statistički značajnu povezanost s niti jednim ispitivanim makroskopskim elementom.

Tablica 13. Makroskopske značajke posteljice, ovoja i pupkovine po skupinama OP, PP, AP i KP.

Ispitanici	OP	PP	AP	KP	p
Broj ispitanica	84	67	70	76	
VELIČINA (g)	648 (361 – 1260)	698 (374 – 1297)	683,5 (360 – 1320)	642 (221 – 1927)	0,3062
OBLIK POSTELJICE					
ovalna	18 (21,4%)	10 (14,9%)	8 (11,4%)	15 (19,7%)	0,2652
okrugla	11 (13,1%)	8 (11,9%)	16 (22,9%)	13 (17,1%)	
srcolika	34 (40,5%)	35 (52,2%)	26 (37,1%)	30 (39,5%)	
bubrežasta	15 (17,9%)	7 (10,4%)	16 (22,9%)	9 (11,8%)	
ostalo	6 (7,1%)	7 (10,4%)	4 (5,7%)	9 (11,8%)	
MAKROSKOPSKE PROMJENE POSTELJICE					
akutni infarkti	5 (6,0%)	3 (4,5%)	6 (8,6%)	9 (11,8%)	0,3573
kronični infarkti	12 (14,3%)	17 (25,4%)	16 (22,9%)	13 (17,1%)	0,2954
krvni podljevi	1 (1,2%)	0 (0,0%)	2 (2,9%)	1 (1,3%)	-
DUŽINA pupkovine (cm)	54 (17 – 79)	52(21 – 76)	50(19 – 75)	52(17 – 87)	0,4788
INSERCIJA PUPKOVINE					
centralna	15 (18,1%)	15 (22,4%)	17 (24,3%)	19 (25,0%)	0,5489
paracentralna	47 (56,6%)	40 (59,7%)	38 (54,3%)	40 (52,6%)	
periferna	18 (21,7%)	12 (17,9%)	12 (17,1%)	17 (22,4%)	
ostalo	3 (3,6%)	0 (0,0%)	3 (4,3%)	0 (0,0%)	
POREMEĆAJI PUPKOVINE					
pravi čvorovi	4 (4,8%)	3 (4,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,3325
lažni čvorovi	32 (38,6%)	31 (46,3%)	36 (51,4%)	29 (38,2%)	
varikoziteti	23 (27,7%)	16 (23,9%)	14 (20,0%)	16 (21,0%)	
torzija	2 (2,4%)	2 (3,0%)	2 (2,9%)	3 (4,0%)	
OVOJI					
glatki	57 (67,9%)	38 (56,7%)	38 (54,3%)	39 (51,3%)	0,0582
zamućeni	5 (6,0%)	6 (9,0%)	16 (22,9%)	13 (17,1%)	
zadebljani	11 (13,1%)	14 (20,9%)	11 (15,7%)	9 (11,8%)	
mekonij	8 (9,5%)	7 (10,4%)	2 (2,9%)	9 (11,8%)	
ostalo	3 (3,6%)	2 (3,0%)	3 (4,3%)	6 (7,9%)	

Legenda. OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

5.4. Mikroskopska analiza posteljica

Sve morfološke mikroskopske značajke prikazane su u obliku **graduiranih vrijednosti skalarnog indeksa (SI)** koji je zbroj intenziteta (KVi) i difuznosti (KNi) izraženosti pojedine značajke, te je mogao imati vrijednosti od 2 do 6 (Tablica 14).

Tablica 14. Skalarni indeksi (SI) mikroskopskih značajki posteljica po skupinama OP, PP, AP, KP

Skalarni indeks (SI)	OP	PP	AP	KP	p
Broj ispitanica	84	67	70	76	
1. AKUTNI INFARKT					
0	12 (14,3%)	7 (10,4%)	8 (11,4%)	3 (4,0%)	s.s. = 12 0,0024
2	36 (42,9%)	20 (29,8)	14 (20,0%)	16 (21,0%)	
3	17 (20,2%)	22 (32,8%)	13 (18,6%)	22 (29,0%)	
4	16 (19,0%)	12 (17,9%)	28 (40,0%)	29 (38,2%)	
5	3 (3,6%)	5 (7,5%)	6 (8,6%)	4 (5,3%)	
6	0 (0,0%)	1 (1,5%)	1 (1,4%)	2 (2,6%)	
2. KRONIČNI INFARKT					
0	1 (1,2%)	1 (1,5%)	1 (1,4%)	1 (1,3%)	s.s. = 12 0,0000
2	22 (26,2%)	4 (6,0%)	1 (1,4%)	1 (1,3%)	
3	16 (19,0%)	7 (10,4%)	7 (10,0%)	2 (2,6%)	
4	21 (25,0%)	22 (32,8%)	17 (24,3%)	18 (23,7%)	
5	14 (16,7%)	14 (20,9%)	20 (28,6%)	25 (32,9%)	
6	10 (11,9%)	19 (28,4%)	24 (34,3%)	29 (38,2%)	
3. PERIVILOZNI FIBRIN					
0	3 (3,6%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	s.s. = 12 0,0002
2	14 (16,7%)	2 (3,0%)	3 (4,3%)	2 (2,6%)	
3	12 (14,3%)	4 (6,0%)	4 (5,7%)	7 (9,2%)	
4	24 (28,6%)	19 (28,4%)	13 (18,6%)	12 (15,8%)	
5	14 (16,7%)	17 (25,4%)	19 (27,1%)	22 (29,0%)	
6	15 (17,9%)	24 (35,8%)	31 (44,3%)	33 (43,4%)	
4. INTERVILOZNI FIBRIN					
0	1 (1,2%)	0 (0,0%)	3 (4,3%)	1 (1,3%)	s.s. = 12 0,0002
2	19 (22,6%)	4 (6,0%)	5 (7,1%)	2 (2,6%)	
3	27 (32,1%)	17 (25,4%)	14 (20,0%)	15 (19,7%)	
4	17 (20,2%)	22 (32,8%)	26 (37,1%)	31 (40,8)	
5	11 (13,1%)	8 (11,9%)	14 (20,0%)	16 (21,0%)	
6	7 (8,3%)	16 (23,9%)	8 (11,4%)	11 (14,5%)	

5. TROMBOZA SPIRALNIH ARTERIJA					
0	60 (71,4%)	53 (79,1%)	59 (84,3%)	57 (75,0%)	
2	9 (10,7%)	4 (6,0%)	4 (5,7%)	4 (5,3%)	
3	7 (8,3%)	5 (7,5%)	4 (5,7%)	5 (6,6%)	
4	4 (4,8%)	2 (3,0%)	2 (2,9%)	7 (9,2%)	
5	2 (2,4%)	0 (0,0%)	1 (1,4%)	2 (2,6%)	
6	1 (1,2%)	3 (4,5%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)	
6. KALCIFIKATI					
0	36 (42,9%)	23 (34,3%)	13 (18,6%)	16 (21,0%)	s.s. = 12 0,0113
2	18 (21,4%)	17 (25,4%)	17 (24,3%)	12 (15,8%)	
3	14 (16,7%)	6 (9,0%)	13 (18,6%)	13 (17,1%)	
4	12 (14,3%)	9 (13,4%)	9 (12,9%)	12 (15,8%)	
5	4 (4,8%)	7 (10,4%)	3 (4,3%)	9 (11,8%)	
6	0 (0,0%)	4 (6,0%)	15 (21,4%)	13 (17,1%)	
7. KORIONSKE RESICE - povećanje gustoće /razgranatosti					
0	22 (26,2%)	4 (6,0%)	1 (1,4%)	1 (1,3%)	s.s. = 15 0,0000
2	26 (31,0%)	10 (14,9%)	3 (4,3%)	4 (5,3%)	
3	7 (8,3%)	6 (9,0%)	5 (7,1%)	4 (5,3%)	
4	15 (17,9%)	15 (22,4%)	5 (7,1%)	13 (17,1%)	
5	6 (7,1%)	11 (16,4%)	23 (32,9%)	16 (21,0%)	
6	8 (9,5%)	21 (31,3%)	33 (47,1%)	38 (50,0%)	
8. FETALNE KAPILARE -povećanje broja					
0	25 (29,8%)	4 (6,0%)	1 (1,4%)	1 (1,3%)	s.s. = 15 0,0000
2	18 (21,4%)	7 (10,4%)	4 (5,7%)	3 (4,0%)	
3	7 (8,3%)	6 (9,0%)	7 (10,0%)	5 (6,6%)	
4	17 (20,2%)	15 (22,4%)	8 (11,4%)	11 (14,5%)	
5	9 (10,7%)	15 (22,4%)	17 (24,3%)	20 (26,3%)	
6	8 (9,5%)	20 (29,8%)	33 (47,1%)	36 (47,4%)	
9. FETALNE KAPILARE - povećanje promjera					
0	25 (29,8%)	9 (13,4%)	5 (7,1%)	3 (4,0%)	s.s. = 15 0,0000
2	14 (16,7%)	10 (14,9%)	5 (7,1%)	7 (9,2%)	
3	11 (13,1%)	9 (13,4%)	9 (12,9%)	6 (7,9%)	
4	20 (23,8%)	14 (20,9%)	18 (25,7%)	15 (19,7%)	
5	11 (13,1%)	17 (25,4%)	11 (15,7%)	22 (29,0%)	
6	3 (3,6%)	8 (11,9%)	22 (31,4%)	23 (30,3%)	
10. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA -zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara					
0	40 (47,6%)	10 (14,9%)	2 (2,9%)	4 (5,3%)	s.s. = 12 0,0000
2	24 (28,6%)	15 (22,4%)	14 (20,0%)	9 (11,8%)	
3	3 (3,6%)	6 (9,0%)	5 (7,1%)	1 (1,3%)	

4	10 (11,9%)	22 (32,8%)	18 (25,7%)	23 (30,3%)	
5	5 (6,0%)	11 (16,4%)	16 (22,9%)	25 (32,9%)	
6	2 (2,4%)	2 (3,0%)	14 (20,0%)	14 (18,4%)	
11. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA -fibroza strome resica					
0	3 (3,6%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	s.s. = 12 0,0000
2	9 (10,7%)	2 (3,0%)	0 (0,0%)	3 (4,0%)	
3	19 (22,6%)	4 (6,0%)	2 (2,9%)	0 (0,0%)	
4	24 (28,6%)	8 (11,9%)	5 (7,1%)	6 (7,9%)	
5	11 (13,1%)	16 (23,9%)	16 (22,9%)	9 (11,8%)	
6	18 (21,4%)	36 (53,7%)	47 (67,1%)	58 (76,3%)	
12. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA - proliferacija citotrofoblasta					
0	10 (11,9%)	2 (3,0%)	2 (2,9%)	4 (5,3%)	s.s. = 15 0,0000
2	29 (34,5%)	7 (10,4%)	7 (10,0%)	7 (9,2%)	
3	11 (13,1%)	9 (13,4%)	3 (4,3%)	7 (9,2%)	
4	22 (26,2%)	31 (46,3%)	17 (24,3%)	21 (27,6%)	
5	6 (7,1%)	8 (11,9%)	26 (37,1%)	21 (27,6%)	
6	6 (7,1%)	10 (14,9%)	15 (21,4%)	16 (21,0%)	
13. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA - prisutnost sincijskih čvorića					
0	4 (4,8%)	2 (3,0%)	2 (2,9%)	3 (4,0%)	s.s. = 12 0,0000
2	30 (35,7%)	10 (14,9%)	8 (11,4%)	9 (11,8%)	
3	17 (20,2%)	13 (19,4%)	4 (5,7%)	9 (11,8%)	
4	19 (22,6%)	21 (31,3%)	22 (31,4%)	25 (32,9%)	
5	9 (10,7%)	14 (20,9%)	22 (31,4%)	19 (25,0%)	
6	3 (3,6%)	7 (10,4%)	12 (17,1%)	11 (14,5%)	
14. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA – ukupno zadebljanje					
0	31 (36,9%)	2 (3,0%)	4 (5,7%)	3 (4,0%)	s.s. = 15 0,0000
2	26 (31,0%)	9 (13,4%)	2 (2,9%)	2 (2,6%)	
3	9 (10,7%)	15 (22,4%)	6 (8,6%)	10 (13,2%)	
4	11 (13,1%)	16 (23,9%)	14 (20,0%)	19 (25,0%)	
5	3 (3,6%)	5 (7,5%)	9 (12,9%)	21 (27,6%)	
6	4 (4,8%)	20 (29,8%)	35 (50,0%)	21 (27,6%)	
15. KORIOAMNIONITIS					
0	77 (91,7%)	65 (97,0%)	67 (95,7%)	66 (86,8%)	s.s. = 6 0,0674
2	3 (3,6%)	0 (0,0%)	2 (2,9%)	7 (9,2%)	
5	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,3%)	
6	4 (4,8%)	2 (3,0%)	0 (0,0%)	2 (2,6%)	

Legenda. OP – rođilja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – rođilja ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – rođilja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – rođilja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

Od petnaest ispitivanih patohistoloških elemenata posteljice, trinaest Skalarnih indeksa (SI) mikroskopskih elemenata pokazalo je statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja. To su: akutni infarkt, kronični infarkt, perivilozni fibrin, intervilozni fibrin, kalcifikati, povećanje broj/razgranatosti korionskih resica, povećanje broja fetalnih kapilara, povećanje promjera fetalnih kapilara, zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, fibroza strome resica, proliferacija citotrofoblasta, prisutnost sincicijskih čvorića, ukupno zadebljanje uteroplacentarne membrane. Za morfološke značajke kojih je učestalost bila premalena (npr. intervilozna tromboza), nije se mogla provesti analiza χ^2 testom. Samo jedan od ispitivanih patohistoloških elemenata (korioamnionitis) nije pokazao statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja.

Semikvantitativna analiza skalarnih indeksa kroz **blagu, umjerenu i naglašenu** izraženost morfoloških značajki pokazala je kako od trinaest prethodno navedenih histoloških parametara, jedino akutni infarkt nije pokazao statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja. Stoga je akutni infarkt isključen iz daljnje analize, jer se pokazao kao nedovoljno osjetljiv parametar (Tablica 15).

Tablica 15. Semikvantitativni prikaz statistički značajnih Skalarnih indeksa (SI) mikroskopskih značajki posteljica po skupinama OP, PP, AP i KP.

Skalarni indeks (SI)	OP	PP	AP	KP	p
Broj ispitanica	84	67	70	76	
1. AKUTNI INFARKT					
blago	48 (57,1%)	27 (40,3%)	22 (31,4%)	19 (25,0%)	0,0021
umjereno	33 (39,3%)	34 (50,8%)	41 (58,6%)	51 (67,1%)	
naglašeno	3 (3,6%)	6 (9,0%)	7 (10,0%)	6 (7,9%)	
2. KRONIČNI INFARKT					
blago	23 (27,4%)	5 (7,5%)	2 (2,9%)	2 (2,6%)	0,0000
umjereno	37 (44,0%)	29 (43,3%)	24 (34,3%)	20 (26,3%)	
naglašeno	24 (28,6%)	33 (49,2%)	44 (62,9%)	54 (71,1%)	
3. PERIVILOZNI FIBRIN					
blago	19 (22,6%)	3 (4,5%)	3 (4,3%)	2 (2,6%)	0,0000
umjereno	36 (42,9%)	23 (34,3%)	17 (24,3%)	19 (25,0%)	
naglašeno	29 (34,5%)	41 (61,2%)	50 (71,4%)	55 (72,4%)	

4. INTERVILOZNI FIBRIN					
blago	22 (26,2%)	4 (6,0%)	8 (11,4%)	3 (4,0%)	0,0006
umjereno	44 (52,4%)	39 (58,2%)	40 (57,1%)	46 (60,5%)	
naglašeno	18 (21,4%)	24 (35,8%)	22 (31,4%)	27 (35,5%)	
5. MIKROKALCIFIKATI					
blago	54 (64,3%)	41 (61,2%)	30 (42,9%)	29 (38,2%)	0,0005
umjereno	26 (30,9%)	15 (22,4%)	22 (31,4%)	25 (32,9%)	
naglašeno	4 (4,8%)	11 (16,4%)	18 (25,7%)	22 (28,9%)	
6. KORIONSKE RESICE - povećanje gustoće /razgranatosti					
blago	48 (57,1%)	14 (20,9%)	4 (5,7%)	5 (6,6%)	0,0000
umjereno	22 (26,2%)	21 (31,3%)	10 (14,3%)	17 (22,4%)	
naglašeno	14 (16,7%)	32 (47,8%)	56 (80,0%)	54 (71,0%)	
7. FETALNE KAPILARE -povećanje broja					
blago	43 (51,2%)	11 (16,4%)	5 (7,1%)	4 (5,3%)	0,0000
umjereno	24 (28,6%)	21 (31,3%)	15 (21,4%)	16 (21,0%)	
naglašeno	17 (20,2%)	35 (52,3%)	50 (71,5%)	56 (73,7%)	
8. FETALNE KAPILARE - povećanje promjera					
blago	39 (46,4%)	19 (28,4%)	10 (14,3%)	10 (13,2%)	0,0000
umjereno	31 (36,9%)	23 (34,3%)	27 (38,6%)	21 (27,6%)	
naglašeno	14 (16,7%)	25 (37,3%)	33 (47,1%)	45 (59,2%)	
9. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA -fibroza strome resica					
blago	12 (14,3%)	3 (4,5%)	0 (0,0%)	3 (4,0%)	0,0000
umjereno	43 (51,2%)	12 (17,9%)	7 (10,0%)	6 (7,9%)	
naglašeno	29 (34,5%)	52 (77,6%)	63 (90,0%)	67 (88,1%)	
10. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA - proliferacija citotrofoblasta					
blago	39 (46,4%)	9 (13,4%)	9 (12,9%)	11 (14,5%)	0,0000
umjereno	33 (39,3%)	40 (59,7%)	20 (28,6%)	28 (36,8%)	
naglašeno	12 (14,3%)	18 (26,9%)	41 (58,5%)	37 (48,7%)	
11. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA - prisutnost sincijskih čvorića					
blago	36 (42,9%)	12 (17,9%)	10 (14,3%)	12 (15,8%)	0,0000
umjereno	36 (42,9%)	34 (50,8%)	26 (37,1%)	34 (44,7%)	
naglašeno	12 (14,2%)	21 (31,3%)	34 (48,6%)	30 (39,5%)	
12. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA – ukupno zadebljanje					
blago	57 (67,9%)	11 (16,4%)	6 (8,6%)	5 (6,6%)	0,0000
umjereno	20 (23,8%)	31 (46,3%)	20 (28,6%)	29 (38,2%)	
naglašeno	7 (8,3%)	25 (37,3%)	44 (62,8%)	42 (55,2%)	

Legenda. OP – roditelj, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelj ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – roditelj puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelj, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

Na temelju prethodno navedenog kao histološki elementi čiji skalarni indeksi su uključenih u izračun **Morfološkog indeksa posteljice (MIP)** bili su: kronični infarkt, perivilozni fibrin, intervilozni fibrin, kalcifikati, povećanje broj/razgranatosti korionskih resica, povećanje broja fetalnih kapilara, povećanje promjera fetalnih kapilara, zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, fibroza strome resica, proliferacija citotrofoblasta, prisutnost sincicijskih čvorića, ukupno zadebljanje uteroplacentarne membrane.

Kronični infarkt pokazao je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da se kao blago i umjereno izražena pojava najčešće javlja u skupini OP s 27,4% i 44,0% učestalosti, dok je najčešće kao naglašena promjena vidljiv u skupini KP sa 71,1% (Tablica 15).

Uspoređujući skupine međusobno, značajka skupine skupine OP je da većina posteljica pokazuje umjereno izražene kronične infarkte (44,0%), dok većina posteljica skupina PP, AP i KP pokazuje naglašeno izražen kronični infarkt također u skupinama PP, AP i KP s 49,2%, 62,9% i 71,1%. Posljedica opisanih rezultata je statistički značajna razlika pojave kroničnog infarkta pri usporedbi skupina OP vs PP ($p=0,0022$), no bez izražene značajnosti uspoređivanjem PP vs AP ($p=0,1955$) i AP vs KP ($p=0,5657$) (Tablica 16).

Perivilozni fibrin pokazao je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da se kao blago i umjereno izražena pojava najčešće javlja u posteljica skupine OP s 22,6% i 42,9% učestalosti, dok je kao naglašena promjena najizraženiji u posteljicama skupine KP sa 72,4% (Tablica 15).

Uspoređivanjem skupina, najveći broj posteljica skupine OP pokazao je umjerenu izražajnost kroničnih infarkta ili 42,9% posteljica, dok su posteljice skupine PP, AP i KP najčešće imale naglašeno izražene kronične infarkte s 61,2%, 71,4% i 72,4% učestalosti, iz čega proizlazi da je statistički značajna razlika učestalosti pojave periviloznog fibrina vidljiva usporedbom OP vs PP ($p=0,0006$), ali ne i pri usporedbi PP vs AP i AP vs KP ($p=0,4221$ i $p=0,8594$) (Tablica 16).

Tablica 16. Usporedba izraženosti histoloških parametara između skupina OP, PP, AP i KP.

Skalarni indeksi (SI)	OP	PP	AP	KP	OP vs PP	PP vs AP	AP vs KP
Broj ispitanica	84	67	70	76	p	p	p
1. KRONIČNI INFARKT							
blago	23 (27,4%)	5 (7,5%)	2 (2,9%)	2 (2,6%)	0,0022	0,1955	0,5657
umjereno	37 (44,0%)	29 (43,3%)	24 (34,3%)	20 (26,3%)			
naglašeno	24 (28,6%)	33 (49,2%)	44 (62,9%)	54 (71,1%)			
2. PERIVILOZNI FIBRIN							
blago	19 (22,6%)	3 (4,5%)	3 (4,3%)	2 (2,6%)	0,0006	0,4221	0,8594
umjereno	36 (42,9%)	23 (34,3%)	17 (24,3%)	19 (25,0%)			
naglašeno	29 (34,5%)	41 (61,2%)	50 (71,4%)	55 (72,4%)			
3. INTERVILOZNI FIBRIN							
blago	22 (26,2%)	4 (6,0%)	8 (11,4%)	3 (4,0%)	0,0027	0,5046	0,2277
umjereno	44 (52,4%)	39 (58,2%)	40 (57,1%)	46 (60,5%)			
naglašeno	18 (21,4%)	24 (35,8%)	22 31,4%)	27 (35,5%)			
4. KALCIFIKATI							
blago	54 (64,3%)	41 (61,2%)	30 (42,9%)	29 (38,2%)	0,0459	0,0976	0,8342
umjereno	26 (30,9%)	15 (22,4%)	22 (31,4%)	25 (32,9%)			
naglašeno	4 (4,8%)	11 (16,4%)	18 (25,7%)	22 (28,9%)			
5. KORIONSKE RESICE - povećanje gustoće /razgranatosti							
blago	48 (57,1%)	14 (20,9%)	4 (5,7%)	5 (6,6%)	0,0000	0,0003	0,4235
umjereno	22 (26,2%)	21 (31,3%)	10 (14,3%)	17 (22,4%)			
naglašeno	14 (16,7%)	32 (47,8%)	56 (80,0%)	54 (71,0%)			
6. FETALNE KAPILARE -povećanje broja							
blago	43 (51,2%)	11 (16,4%)	5 (7,1%)	4 (5,3%)	0,0000	0,0541	0,8883
umjereno	24 (28,6%)	21 (31,3%)	15 (21,4%)	16 (21,0%)			
naglašeno	17 (20,2%)	35 (52,3%)	50 (71,5%)	56 (73,7%)			
7. FETALNE KAPILARE - povećanje promjera							
blago	39 (46,4%)	19 (28,4%)	10 (14,3%)	10 (13,2%)	0,0092	0,1254	0,3083
umjereno	31 (36,9%)	23 (34,3%)	27 (38,6%)	21 (27,6%)			
naglašeno	14 (16,7%)	25 (37,3%)	33 (47,1%)	45 (59,2%)			
8. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA -zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara							
blago	64 (76,2%)	26 (38,8%)	17 (24,3%)	13 (17,1%)	0,0000	0,0109	0,4761
umjereno	13 (15,5%)	28 (41,8%)	23 (32,9%)	24 (31,6%)			
naglašeno	7 (8,3%)	13 (19,4%)	30 (42,8%)	39 (51,3%)			
9. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA -fibroza strome resica							
blago	12 (14,3%)	3 (4,5%)	0 (0,0%)	3 (4,0%)	0,0000	0,0705	0,2278
umjereno	43 (51,2%)	12 (17,9%)	7 (10,0%)	6 (7,9%)			
naglašeno	29 (34,5%)	52 (77,6%)	63 (90,0%)	67 (88,1%)			

10. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA - proliferacija citotrofoblasta							
blago	39 (46,4%)	9 (13,4%)	9 (12,9%)	11 (14,5%)	0,0001	0,0004	0,4737
umjereno	33 (39,3%)	40 (59,7%)	20 (28,6%)	28 (36,8%)			
naglašeno	12 (14,3%)	18 (26,9%)	41 (58,5%)	37 (48,7%)			
11. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA - prisutnost sincicijskih čvorića							
blago	36 (42,9%)	12 (17,9%)	10 (14,3%)	12 (15,8%)	0,0017	0,1190	0,5342
umjereno	36 (42,9%)	34 (50,8%)	26 (37,1%)	34 (44,7%)			
naglašeno	12 (14,2%)	21 (31,3%)	34 (48,6%)	30 (39,5%)			
12. UTEROPLACENTARNA MEMBRANA – površina							
blago	57 (67,9%)	11 (16,4%)	6 (8,6%)	5 (6,6%)	0,0000	0,0110	0,4615
umjereno	20 (23,8%)	31 (46,3%)	20 (28,6%)	29 (38,2%)			
naglašeno	7 (8,3%)	25 (37,3%)	44 (62,8%)	42 (55,2%)			

OP – roditelj, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelj ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – roditelj puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelj, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

blago izraženi SI

umjereno izraženi SI

naglašeno izraženi SI

Intervilozni fibrin pokazao je statistički značajnu povezanost ($p=0,0006$) s kategorijom pušenja na način da se kao blago izražena promjena najčešće javlja u skupini OP s 26,2 % učestalosti, kao umjereno izražena promjena u skupini KP s 60,5% učestalosti i kao naglašeno izražena promjena najčešće je prisutan s 35,8% u skupini PP (Tablica 15).

Većina posteljica svih skupina pokazale su najčešće umjerenu izraženost interviloznog fibrina: 53,4% učestalosti u skupini OP, 58,2% učestalosti u skupini PP, 57,1% učestalosti u skupini AP, te 60,5% učestalosti u skupini KP. Statistički značajna razlika u pojavi interviloznog fibrina utvrđena je usporedbom skupine OP vs PP ($p=0,0027$), ali ne i usporedbom PP vs AP ($p=0,5046$) i AP vs KP ($p=0,2277$) (Tablica 16).

Mikrokalcfikati su pokazali statistički značajnu povezanost ($p=0,0005$) s kategorijom pušenja na način da se kao blago izražena promjena najčešće vide u skupini OP s 64,3%, dok se kao umjereno i naglašeno izražena promjena najčešće vide u skupini KP s 32,9% i 28,9% učestalosti (Tablica 15).

Usporedbom skupina, posteljice svih skupina najčešće su pokazale blagu izraženost mikrokalcifikata: 64,3% u skupini OP, 61,2% u skupini PP, 42,9% u skupini AP i 38,2% u skupini KP. Statistički značajna razlika u izražajnosti mikrokalcifikata postoji pri usporedbi skupina PP s AP ($p=0,0459$), ali ne i usporedbom PP s AP ($p=0,0976$) i AP vs KP ($p=0,8342$) (Tablica 16).

Povećanje gustoće odnosno razgranatosti korionskih resica pokazalo je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da se povećanje gustoće/razgranatosti korionskih resica kao blaga pojava najčešće javljalo u skupini OP s 57,1% učestalosti, umjereno u skupini PP s 31,3% dok je kao naglašena promjena najčešće bilo vidljivo u skupini AP s 80% učestalosti (Tablica 15).

Usporedbom skupina otkriva se kako su posteljice skupine OP najčešće pokazale blagu izraženost ove promjene (57,2%), dok je najveći broj posteljica skupina PP, AP i KP pokazao naglašeno povećanje gustoće korionskih resica koje je bilo vidljivo u 47,8%, 80,0% i 71% posteljica. Statistički značajna razlika u učestalosti povećanja gustoće/razgranatosti korionskih resica postoji pri usporedbi OP s PP ($p=0,0000$) i PP s AP ($p=0,0003$), ali ne kod AP s KP ($p=0,4235$) (Tablica 16).

Povećanje broja kapilara korionskih resica pokazalo je statistički značajnu povezanost ($p=0,000$) s kategorijom pušenja na način da je blago izraženo povećanje najčešće bilo vidljivo u skupini OP s 51,2% učestalosti, umjereno u skupini PP s 31,3%, dok je naglašeno povećanje broja kapilara korionskih resica bilo prominentno u 73,7% posteljica skupine KP (Tablica 15).

Međusobnim uspoređivanjem skupina, uočeno je kako je pretežiti dio posteljica skupine PP ili 51,2% pokazao blago povećanje broja korionskih kapilara, dok su posteljice skupina PP, AP i KP pokazale s 52,3%, 71,5% i 73,7% učestalosti naglašeno povećanje. Statistički značajna razlika u učestalosti povećanja broja korionskih resica pokazala se pri usporedbi OP s PP ($p=0,0000$), dok statistički značajne razlike nije bilo pri usporedbi PP s AP ($p=0,0541$) i AP s KP ($P=0,8883$). (Tablica 16).

Povećanje promjera korionskih kapilara pokazalo je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da je kao blago izražena pojava bilo najčešće vidljivo u skupini OP s 46,4% učestalosti, kao umjereno izražena najčešće u skupini AP s 38,6%, dok se naglašeno povećanje promjera kapilara moglo uočiti u najvećem broju posteljica skupine KP ili u 59,2% (Tablica 15).

Usporedbom skupina pokazalo se kako u skupini OP najveći broj posteljica ili 46,4% pokazuje blago povećanje promjera, dok najveći udio posteljica skupina PP, AP i KP pokazuje naglašeno povećanje promjera kapilara korionskih resica s 37,3%, 47,1% i 59,2% učestalosti. Statistički značajna razlika u izraženosti povećanja promjera kapila utvrđena je pri usporedbi skupine OP s PP ($p=0,0092$), ali ne i usporedbom skupina PP s AP ($p=0,1254$) i AP s KP ($p=0,3083$) (Tablica 16).

Zadebljanje bazalne membrane kapilara korionskih resica pokazalo je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da se kao blago izražena promjena najčešće vidi u skupini OP sa 76,2% učestalosti, kao srednje izražena promjena u skupini PP s 41,8% dok je promjena bila naglašena najčešće u skupini KP s 51,3% (Tablica 15).

Gledano po skupinama, značajka skupine OP jest da većina posteljica ili 76,2% pokazuje blago zadebljanje membrane kapilara korionskih resica kao što je prethodno navedeno, značajka skupine PP je većinom umjereno zadebljanje i to u 41,8% posteljica, dok su postlejiice skupina AP i KP imale pretežito naglašeno zadebljanje bazalne membrane korionskih resica u 42,8% i 51,3% posteljica. Statistički značajna razlika izraženosti ovog histološkog parametra pokazala se pri usporedbi OP s PP ($p=0,0000$) i PP s AP ($p=0,0109$), ali ne i usporedbom AP s KP ($p=0,4761$) (Tablica 16).

Fibroza strome korionskih resica pokazala je statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja ($p=0,0000$) na način da se kao blaga i umjereno izražena promjena najčešće uočljiva u skupini OP s 14,3% i 51,2%, dok se kao naglašena vidjela najčešće u skupini AP s 90,0% učestalosti (Tablica 15).

Usporedbom skupina pokazalo se kako je pretežiti dio posteljica skupine OP ili 51,2% pokazao umjerenu izraženost fibroze, dok su posteljice skupina PP, AP i KP pokazale većinom naglašenu fibrozu korionskih resica i to u 77,6%, 90,0% i 88,1% posteljica. Statistički značajna razlika utvrđena je pri usporedbi izražajnosti fibroze između skupina OP s PP ($p=0,0000$), ali ne i između PP s AP ($p=0,0705$) i AP s KP ($p=0,2278$) (Tablica 16).

Proliferacija citotrofoblasta pokazala je statistički značajnu povezanost ($p=0,0001$) s kategorijom pušenja na način da se kao blaga promjena proliferacija vidjela najčešće u skupini OP s 46,4% učestalosti, kao umjerena bila je najzamjetljivija u skupini PP s 59,7% te kao naglašena u skupini KP s 48,7% ($p=0,0001$) (Tablica 15).

Usporednim pregledom, većina posteljica skupine OP pokazuje blagu proliferaciju citotrofoblasta ili 46,4, većina posteljica skupine PP umjerenu s 59,7% učestalosti, dok skupine AP i KP karakterizira naglašena proliferacija citotrofoblasta u većini posteljica s 58,5% odnosno 48,7% učestalosti. Statistički značajna razlika izraženosti proliferacije citotrofoblasta utvrđena je pri usporedbi OP s PP ($p=0,0001$) i PP s AP ($p=0,0004$), ali ne i usporedbom AP s KP (Tablica 16).

Prisutnost sincicijskih čvorića pokazala je statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja ($p=0,0000$) na način da je najčešće blago izražena u većini posteljica skupine OP s 42,9%, umjereno najčešće u posteljica skupine PP s 50,8% te naglašeno u posteljica skupine AP s 48,6% (Tablica 15).

S obzirom na skupine, značajke posteljica skupine OP je blaga i umjerena prisutnost sincicijskih čvorića u jednakom postoku odnosno s 42,9%, značajke skupina PP i KP su posteljice koje najčešće ili u 50,8% odnosno 44,7% posteljica pokazuju umjerenu prisutnost sincicijskih čvorića, dok je skupina AP karakterizirana naglašenom prisutnošću sincicijskih čvorića u 48,6% učestalosti. Statistički značajna razlika utvrđena usporedbom OP s PP ($p=0,0017$), ali ne PP s AP ($p=0,1190$) i AP s KP ($p=0,5342$) (Tablica 16).

Zadebljanje bazalne membrane pokazalo je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da se kao blaga promjena najčešće javlja

većinom u skupini OP s učestalosti od 67,9%, kao umjerena u skupini PP s 46,3% i naglašena u skupini AP s 62,8% (Tablica 15).

Ako promatramo po skupinama, tada je značajka skupine OP blago zadebljanje uteroplacentarne membrane vidljivo u većine posteljica ili 67,9%, značajka skupine PP je umjereno zadebljanje vidljivo u 50,8% posteljica, dok je značajka skupina AP i KP naglašeno zadebljanje uteroplacentarne membrane s vidljivo u već spomenutih 62,8% za skupinu AP i 55,2% za skupinu KP. Statistički značajna razlika izraženosti zadebljanja uteroplacentarne membrane utvrđena je usporedbom OP s PP ($p=0,0000$) i PP s AP ($p=0,0110$), ali ne i usporedbom AP s KP ($p=0,4615$). (Tablica 16).

Zaključno, usporedna analiza histoloških parametara, prikazana u tablici 16., omogućila je prepoznavanje statistički značajnih parametara za svaku od skupina.

Skupina OP karakterizirana je pretežito **blago** izraženim histološkim parametrima (mikrokalcifikati, povećanje gustoće, broja, promjera korionskih kapilara, zadebljanje bazalne membrane, proliferacija citotrofoblasta, prisutnost sincicijskih čvorića, povećanje površine uteroplacentarne membrane) i manjim brojem **umjereno** izraženih histoloških parametara (kronični infarkt, perivilozni fibrin, intervilozni fibrin, fibroza strome resica). Drugim riječima većina posteljica skupine OP ne pokazuje naglašeno izražene morfološke elemente.

Skupina PP karakterizirana je podjednako učestalošću **umjereno** (akutni infarkt, intervilozni fibrin, zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, proliferacija citotrofoblasta prisutnost sincicijskih čvorića) i **naglašeno** izraženih histoloških parametara (kronični infarkt, perivilozni fibrin, povećanje gustoće, broja i promjera korionskih resica, fibroza strome resica), dok je samo jedan parametar (mikrokalcifikati) pokazao blagu izraženost.

Skupina AP i KP karakterizirana je pretežito **naglašeno** izraženim histološkim parametrima (kronični infarkt, perivilozni fibrin, povećanje gustoće korionskih resica, povećanje broja i promjera korionskih kapilara, zadebljanje bazalne membrane

korionskih kapilara, fibroza strome resica, proliferacija sincicijskih čvorića, povećanje površine uteroplacentarne membrane) dok je samo jedan parametar pokazao blagu (mikrokalcifikati) i jedan umjerenu (intervilozni fibrin) izraženost.

Drugim riječima, posteljice koje nisu izložene duhanskom dimu (OP) nemaju niti jedan naglašeno izraženi parametar. U skladu s prethodnim je i činjenica kako su svi histološki elementi pokazali statistički značajnu razliku izraženosti u odnosu na posteljice koje su na bilo koji način izložene duhanskom dimu (PP, AP, KP). Prema tome, blaga izraženost većine parametara, uz odsustvo naglašene izraženosti, obrazac je za prepoznavanje terminskih posteljica koje nisu bile izložene duhanskom dimu.

Povećanje gustoće/razgranatosti korionskih resica, zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, proliferacija citotrofoblasta, te zadebljanje/povećanje površine uteroplacentarne membrane se statistički značajno češće u naglašenom obliku javljaju u skupinama koje sadrže komponentu aktivnog pušenja (skupine AP i KP). Iz navedenog proizlazi opažanje kako podjednaka učestalost umjereno i naglašeno izraženih histoloških parametara značajka je posteljica pasivno izloženih duhanskom dimu pri čemu se značajno češće prethodno navedeni javljaju u umjerenom obliku.

Posteljice koje su aktivno bile izložene duhanskom dimu tijekom cijele trudnoće, sa ili bez pasivne izloženosti (skupina KP i skupina AP) pokazale u većinom naglašenu izraženost. Statistički značajno se svi parametri osim mikrokalcifikata javljaju češće kao naglašena promjena u odnosu na posteljice koje nisu bile izložene duhanskom dimu (skupina OP), dok se povećanje gustoće/razgranatosti korionskih resica, zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, proliferacija citotrofoblasta, te zadebljanje/povećanje površine uteroplacentarne membrane javljaju kao naglašene promjene značajno češće u odnosu na posteljice koje su bile izložene pasivnom pušenju. Prema tome naglašena izraženost gotovo svih parametara obrazac je za histološko prepoznavanje posteljica koje su aktivno i/ili kombinirano bile izložene duhanskom dimu.

Usporedna analiza svakog od dvanaest isključnih histoloških parametara prikazana u tablici 16, pokazala je kako pojedini morfološki parametri mogu poslužiti kao

histološki graničnici za prepoznavanje izloženosti posteljice duhanskom dimu već pri pregledu svjetlosnim mikroskopom.

Zaključno se može reći kako je patohistološkim pregledom posteljica bojanih H/E metodom bilo moguće razlikovati posteljice skupine OP od ostalih posteljica. Između posteljica izloženih duhanskom dimu, bilo je moguće histološkim pregledom izdvojiti posteljice skupine PP. Razlučivanje posteljica AP u odnosu na KP nije bilo moguće patohistološkom analizom s obzirom na istovjetnu zastupljenost histoloških značajki.

5.5. Morfološki indeks posteljice (MIP)

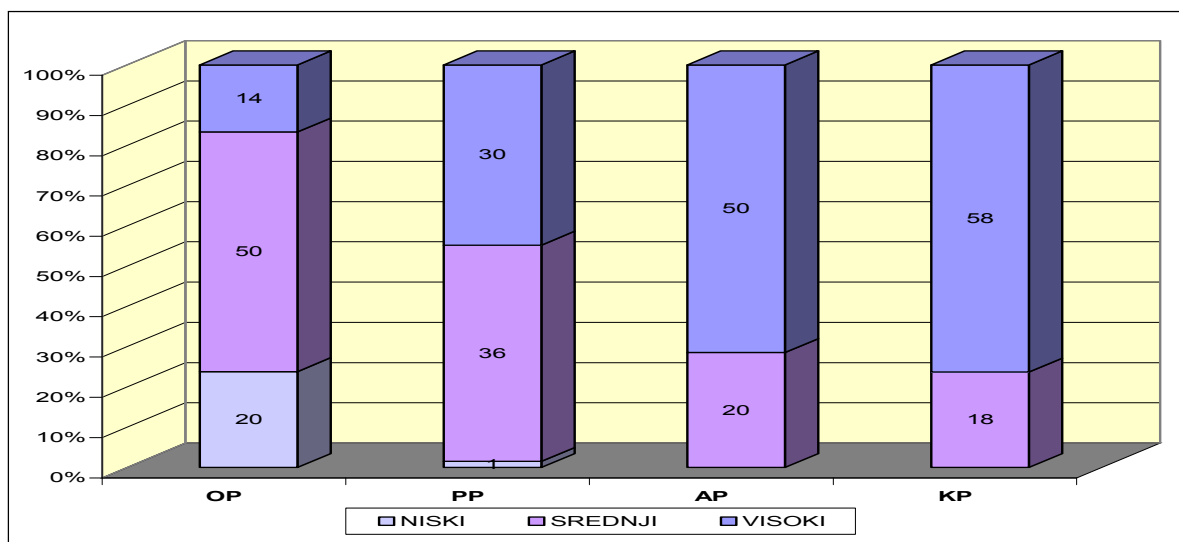
Morfološki indeks posteljice (MIP) koji kao zbroj dvanaest skalarnih indeksa za svaku pojedinu posteljicu može biti niski (0-26), srednji (27-52) ili visoki (53-72) smješta posteljicu u kategoriju niske, srednje ili visoke intoksikacije duhanskim dimom. Drugim riječima skalarni indeksi su morfološki pokazatelji intoksikacije duhanskim dimom koji se radi pojednostavljenja, ali i sveobuhvatnijeg pregleda, svode u jedan zajednički morfološki indeks (Tablica 17).

Tablica 17. Morfološki indeks posteljice (MIP).

Morfološki indeks posteljice (MIP)	OP	PP	AP	KP	p
niski	20 (23,8%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,0000
srednji	50 (59,5%)	36 (53,7%)	20 (28,6%)	18 (23,7%)	
visoki	14 (16,7%)	30 (44,8%)	50 (71,4%)	58 (76,3%)	
MI (medijan)	33,5 (10-66)	50 (23-72)	58 (29-73)	60 (33-73)	0,0000

OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

MIP je pokazao statistički značajnu povezanost s kategorijom pušenja ($p=0,0000$) na način da je najveća zastupljenost posteljica s niskim i srednjim MIP bila u skupini OP s 23,8% i 59,5% učestalosti, dok je visoki MIP predominirao u posteljica skupine KP sa 76,3% (Slika 6, Tablica 17).



Slika 6. Ocjena Morfološkog indeksa posteljice (MIP) obzirom na pušačku kategoriju majke;
X²-kvadrat test: p = 0,0000.

Gledano po skupinama, uočava se kako skupine OP i PP karakterizira najveći broj posteljica sa srednjim MIP ili 59,5%, dok je u skupinama AP i KP predominirao visoki MIP sa 71,4% i 76,3% zastupljenosti. Iz prethodnog proizlazi kako je statistički značajna razlika prisutna u vrijednostima MIP pri usporedbi OP s PP (p=0,0000) i PP s AP (p=0,0021), ali ne i AP s KP (p=0,5014) (Tablica 18).

Tablica 18. Morfološki indeks posteljice (MIP) po skupinama OP, PP, AP i KP.

Morfološki indeks posteljice (MIP)	OP	PP	AP	KP	OP vs PP	PP vs AP	AP vs KP
Broj ispitanica	84	67	70	76	p	p	p
niski	20 (23,8%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,0000	0,0021*	0,5014*
srednji	50 (59,5%)	36 (53,7%)	20 (28,6%)	18 (23,7%)			
visoki	14 (16,7%)	30 (44,8%)	50 (71,4%)	58 (76,3%)			
MIP (prosjeak)	33,5 (10-66)	50 (23-72)	58 (29-73)	60 (33-73)	0,0000	0,0002	0,5215

*X²-kvadrat izračunat bez kategorije «niski MI»

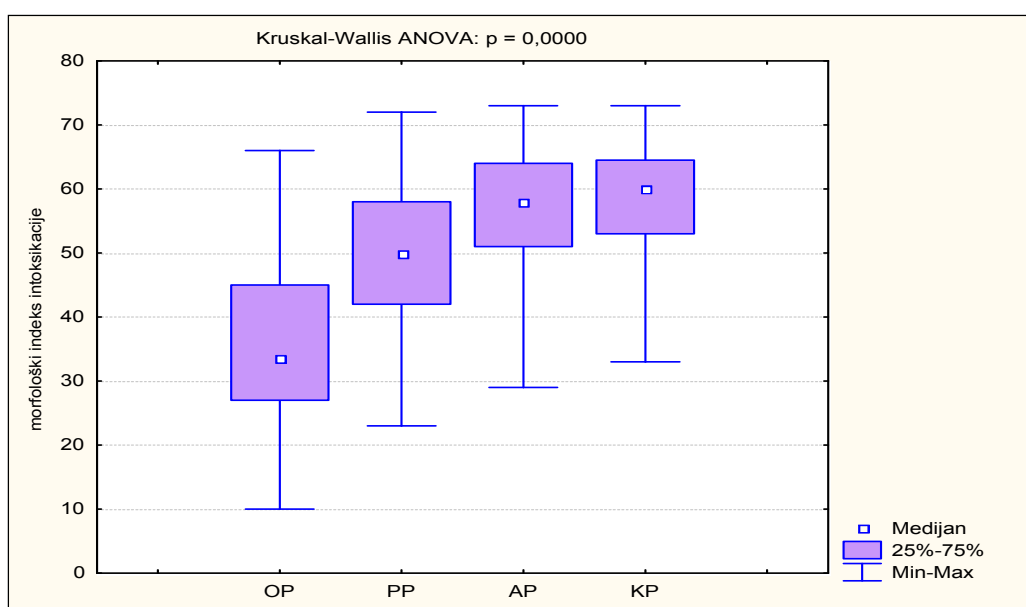
OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

srednji MIP

visoki MIP

Medijan skupina s obzirom na MIP još preciznije dočarava razliku pa je tako medijan za OP 33,5 što je bliže donjoj granici srednjeg stupnja intoksikacije za razliku od

medijana za PP koji je 50 i nalazi se pri samoj gornjoj granici srednjeg stupnja intoksikacije. Medijani skupina AP i KP iznose 58 i 60 što odgovara visokom stupnju intoksikacije posteljica. Ova jasna diferentnost rezultata očituje se i kroz izračun statistički značajne razlike medijana MIP pri usporedbi skupina. Naime, utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti medijana za MIP pri usporedbi OP vs PP ($p=0,000$) i PP s AP ($p=0,0002$), ali ne i usporedbom AP s KP ($p=0,5215$) (Slika 6 i 7, Tablica 17).



Slika 7. Morfološki indeks posteljice (MIP) obzirom na pušačku kategoriju majke.

5.6. Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska analiza pokazala je statističku značajnu povezanost s kategorijom pušenja za HSP-70 ($p=0,0000$), metalotionein ($p=0,0000$) i p53 ($p=0,0000$), ali ne i za bcl-2 ($p=0,2343$) (Tablica 19).

p53 je bio statistički značovit, ali se rasap grupirao, što je značilo nisku osjetljivost parametra, pa je zajedno s bcl-2 isključen iz daljnjeg definiranja imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP).

Tablica 19. Imunohistokemijska analiza posteljice po skupinama OP, PP, AP i KP.

Skalarni indeks (SI)	OP	PP	AP	KP	p
Broj ispitanica	84	67	70	76	
HSP-70					
2	20 (24,1%)	3 (4,7%)	1 (1,5%)	1 (1,4%)	s.s. = 12 0,0000
3	25 (30,1%)	2 (3,1%)	3 (4,6%)	0 (0,0%)	
4	22 (26,5%)	10 (15,6%)	12 (18,5%)	10 (14,3%)	
5	8 (9,6%)	26 (40,6%)	29 (44,6%)	38 (54,3%)	
6	8 (9,6%)	23 (35,9%)	20 (30,8%)	21 (30,0%)	
METALOTIONEIN					
2	5 (6,2%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	s.s. = 12 0,0000
3	12 (15,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	
4	34 (42,5%)	13 (21,0%)	16 (24,6%)	15 (22,4%)	
5	17 (21,2%)	26 (41,9%)	25 (38,5%)	23 (34,3%)	
6	12 (15,0%)	22 (35,5%)	24 (36,9%)	27 (40,3%)	
Bcl 2					
2	2 (2,5%)	3 (5,1%)	2 (3,3%)	2 (3,0%)	s.s. = 12 0,2343
3	1 (1,3%)	3 (5,1%)	0 (0,0%)	10 (15,2%)	
4	3 (3,8%)	5 (8,5%)	5 (8,2%)	10 (15,2%)	
5	25 (31,6%)	18 (30,5%)	27 (44,3%)	23 (34,8%)	
6	48 (60,8%)	30 (50,8%)	27 (44,3%)	30 (45,4%)	
p 53					
4	37 (45,7\$)	36 (58,1%)	36 (54,6%)	34 (49,3%)	s.s. = 6 0,0000
5	15 (18,2%)	20 (32,3%)	30 (45,4%)	28 (40,6%)	
6	29 (35,8%)	6 (9,7%)	0 (0,0%)	7 (10,1%)	

Legenda: OP – roditelj, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelj ne puši, partner i/ ili ukućani puše; AP – roditelj puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelj, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

Dakle od četiri ispitivana imunohistokemijska markera svega su skalarni indeksi (SI) metalotioneina i HSP-70 pokazali adekvatnim za daljnju semikvantitativnu analizu skalarnih indeksa kroz **blagu, umjerenu i naglašenu** izraženost imunohistokemijskih reakcija (Tablica 20).

Tablica 20. Usporedba izražajnosti Hsp70 i Metalotioneina za skupine OP, PP, AP i KP.

Skalarni indeksi (SI)	OP	PP	AP	KP	OP vs PP	PP vs AP	AP vs KP
Broj	84	67	70	76	p	p	p
HSP 70							
blago	21 (25,0%)	6 (9,0%)	6 (8,6%)	7 (9,2%)	0,0000	0,8747	0,4149
umjereno	47 (56,0%)	12 (17,9%)	15 (21,4%)	10 (13,2%)			
naglašeno	16 (19,0%)	49 (73,1%)	49 (70,0%)	59 (77,6%)			
METALOTIONEIN							
blago	9 (10,7%)	6 (9,0%)	5 (7,1%)	10 (13,2%)	0,0000	0,8411	0,4886
umjereno	46 (54,8%)	13 (19,4%)	16 (22,9%)	16 (21,0%)			
naglašeno	29 (34,5%)	48 (71,6%)	49 (70,0%)	50 (65,8%)			

Legenda: OP – roditelj, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelj ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelj puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelj, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

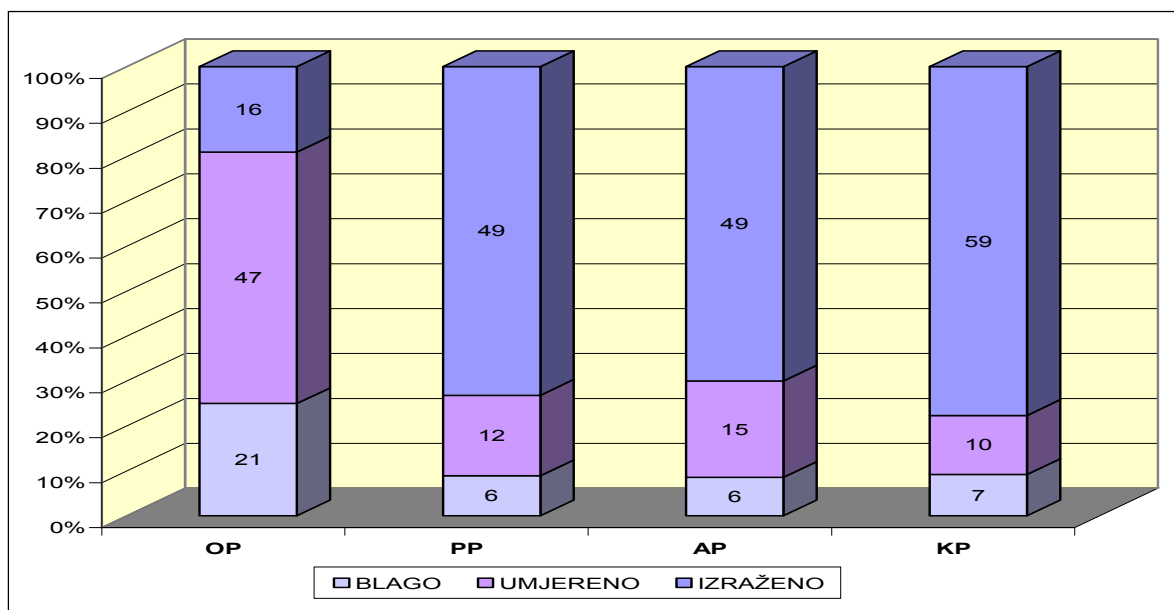
umjereno izraženi SI

naglašeno izraženi SI

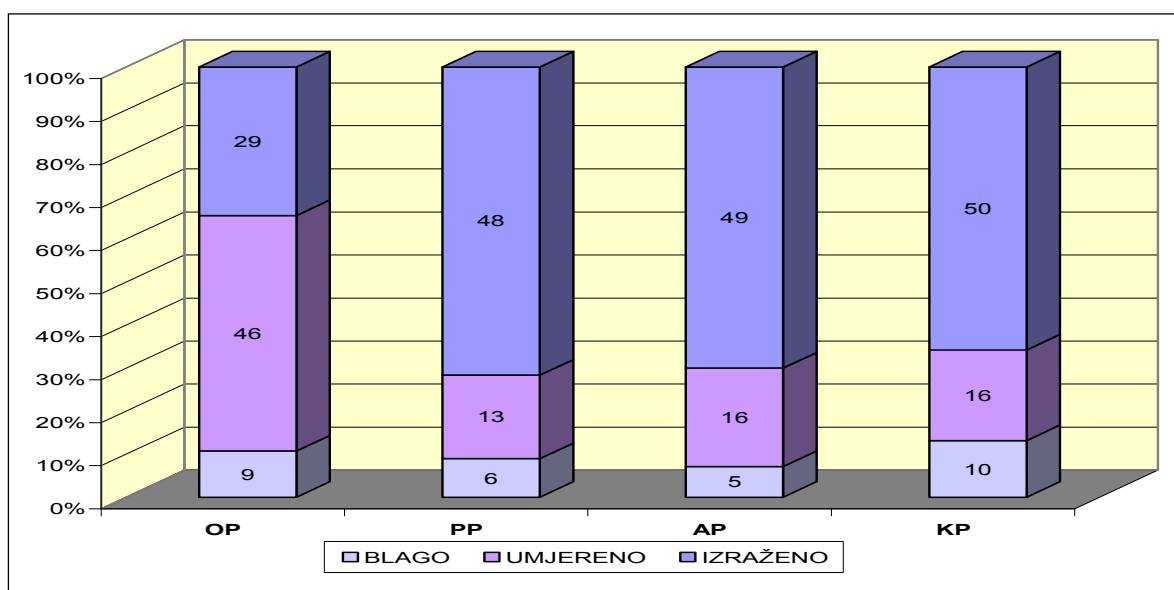
HSP-70 pokazao je statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da je najveći broj posteljica s blagom i umjerenom izražajnošću Hsp-70 bila vidljiva u skupini OP s 25% odnosno 56% učestalosti, dok je najveći broj posteljica s naglašenom izražajnošću HSP-70 bila u skupini KP sa 77,6% (Tablica 20, Slika 8).

Promatrano po skupinama, posteljice skupine OP pokazivale su najčešće umjerenu izražajnost s 56,0% učestalosti, dok su posteljice skupina PP, AP i KP pokazivale većinom naglašenu izražajnost markera sa 73,1%, 70,0% i 77,6% učestalosti. Iz prethodnog proizlazi statistički značajna razlika izražajnosti Hsp70 usporedbom OP s PP ($p= 0,000$), dok se usporedbom PP s AP ($p=0,8747$) i AP s KP ($p=0,4149$) statistička značajnost gubi (Tablica 20).

Metalotionein je pokazao statistički značajnu povezanost izražajnosti s kategorijom pušenja ($p= 0,0000$) na način da je najveći udio posteljica s blagom izražajnošću markera bila vidljiva u 13,2% posteljica skupine KP, dok je najveći udio posteljica s umjerenom izražajnošću bila u posteljica OP skupine s 54,8% učestalosti. Najveći udio posteljica s naglašenom izražajnošću bila je vidljiva u skupini PP sa 71,6% učestalosti ($p= 0,0000$). (Tablica 20, Slika 9).



Slika 8. Izraženost markera HSP-70 obzirom na naviku pušenja u majke.
X²-kvadrat test: p = 0,0000



Slika 9. Izraženost markera METALOTIONEIN obzirom na naviku pušenja u majke.
X²-kvadrat test: p = 0,0000

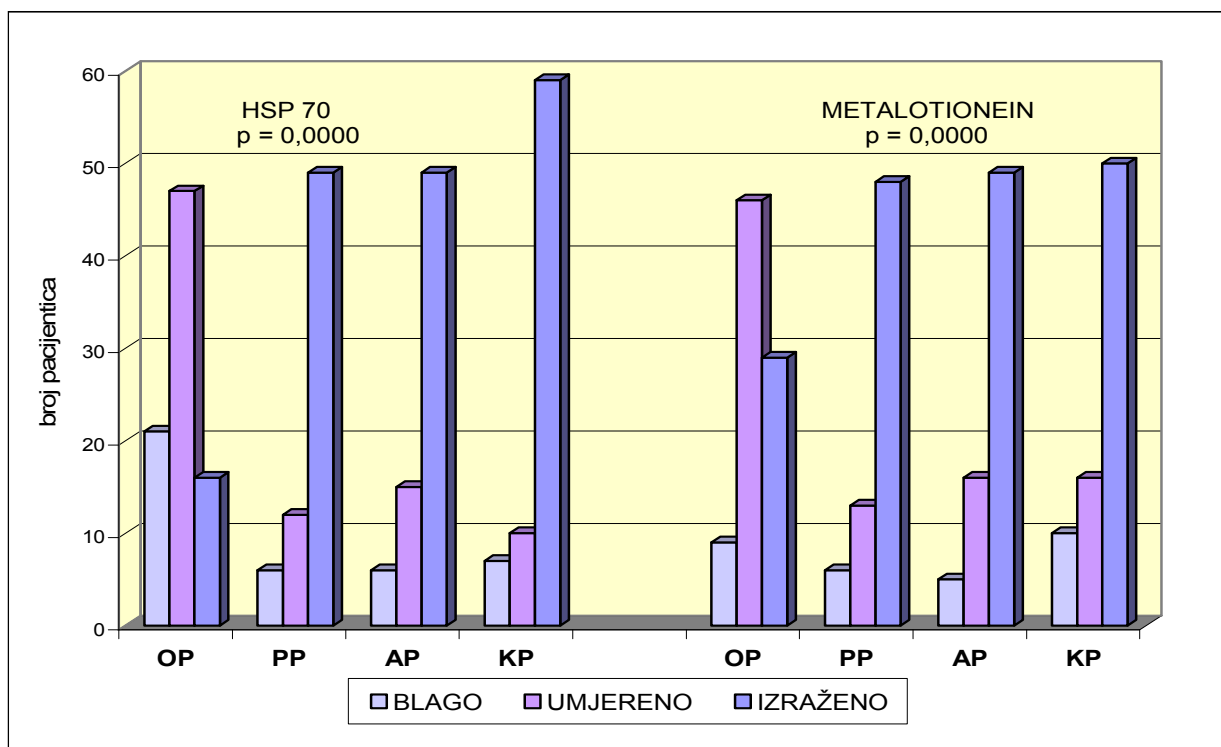
Ako izražajnost imunohistokemijske reakcije promatramo po skupinama, tada su posteljice skupine OP pretežito pokazale umjerenu izražajnost metalotioneina u 54,8% posteljica, dok je izražajnost u sve tri preostale skupine PP, AP i KP bila pretežito naglašena sa 71,6% posteljica u skupini PP, sa 70,0% posteljica u skupini AP, te 65,8% posteljica u skupini KP.

Prethodno navedeno imalo je za posljedicu izraženu statistički značajnu razliku usporedbom OP s PP ($p=0,0000$), dok je usporedba PP s AP te AP s KP bila bez statistički značajne razlike s $p=0,8411$ odnosno $p=0,4886$ (Tablica 20). Usporedna analiza imunohistokemijskih markera, prikazana u tablici 20, omogućila je prepoznavanje statistički značajnih parametara za svaku od skupina koji mogu pomoći pri detektiranju intoksikacije posteljica.

Skupina OP karakterizirana je pretežito **umjerenom** izražajnošću skalarnih indeksa HSP-70 i Metalotioneina (Slika 10).

Skupine PP, AP i KP karakterizirane su pretežito **naglašenom** izražajnošću skalarnih indeksa HSP-70 i Metalotioneina (Slika 10).

Drugim riječima, imunohistokemijskim metodama su se mogle razlikovati posteljice koje nisu bile izložene duhanskom dimu (skupina OP) od posteljica koje su bile izložene (skupina PP, AP, KP). Imunohistokemijska analiza nije pokazala razliku u izražajnosti markera s obzirom na pasivnu ili aktivnu izloženost duhanskom dimu, odnosno njihovu kombinaciju.



Slika 10. Izraženost markera obzirom na pušačku kategoriju majke

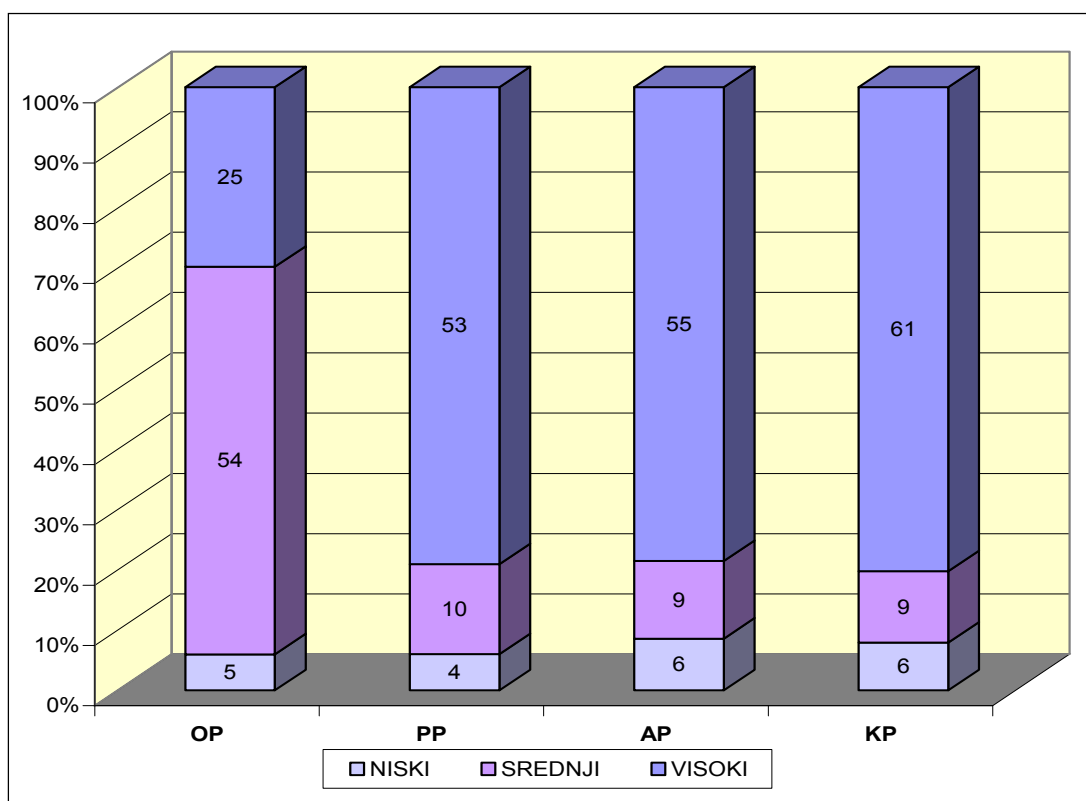
5.6. Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)

Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP) kao zbroj skalarnih indeksa (SI) za HSP-70 i metalotionein mogao je imati raspon od minimalno 4 do maksimalno 12. Grupiranjem rezultata, dobile su se tri vrijednosne skupine koje predočavaju niski, srednji i visoki IHIP (Tablica 21, Slika 11).

Tablica 21. Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP) po skupinama OP, PP, AP, KP.

Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)	OP	PP	AP	KP	p
niski	5 (5,9%)	4 (6,0%)	6 (8,6%)	6 (7,9%)	0,0000
srednji	54 (64,3%)	10 (14,9%)	9 (12,9%)	9 (11,8%)	
visoki	25 (29,8%)	53 (79,1%)	55 (78,5%)	61 (80,3%)	
IHIP (medijan)	7 (0 – 12)	10 (0 – 12)	10 (0 – 12)	10 (0 – 12)	0,0000

Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike



Slika 11. Ocjena Imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP) obzirom na pušačku kategoriju majke; X²-kvadrat test: p = 0,0000.

IHIP se također može promatrati u odnosu na cjelokupnu populaciju posteljica ali i unutar skupina, te omogućuje prikazivanje prosječne reaktivnosti skupine kao i njihovu usporedbu.

U tom smislu se može reći kako je IHIP pokazao statistički značajnu povezanost ($p=0,0000$) s kategorijom pušenja na način da je niski IHIP najčešće opažen u posteljica skupine KP sa 7,9%, srednji u posteljica skupine OP sa 64,3%, te naglašeni u posteljica skupine KP s 80,3%.

Analizom IHIP unutar skupina, dolazimo do podatka kako **skupinu OP** karakterizira najveći broj posteljica sa **srednjim** IHIP-om ili 64,3%, dok u **skupinama PP, AP i KP** dominiraju posteljice s **visokim** IHIP-om i to: 79,1% posteljica u skupini PP, 78,5% posteljica u skupini AP, te 80,3% posteljica u skupini KP. Međusobnom usporedbom, rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u slučaju OP s PP ($p=0,0000$), ali ne i uspoređivanjem PP s AP ($p=0,8089$) i AP s KP ($p=0,9699$) (Tablica 22).

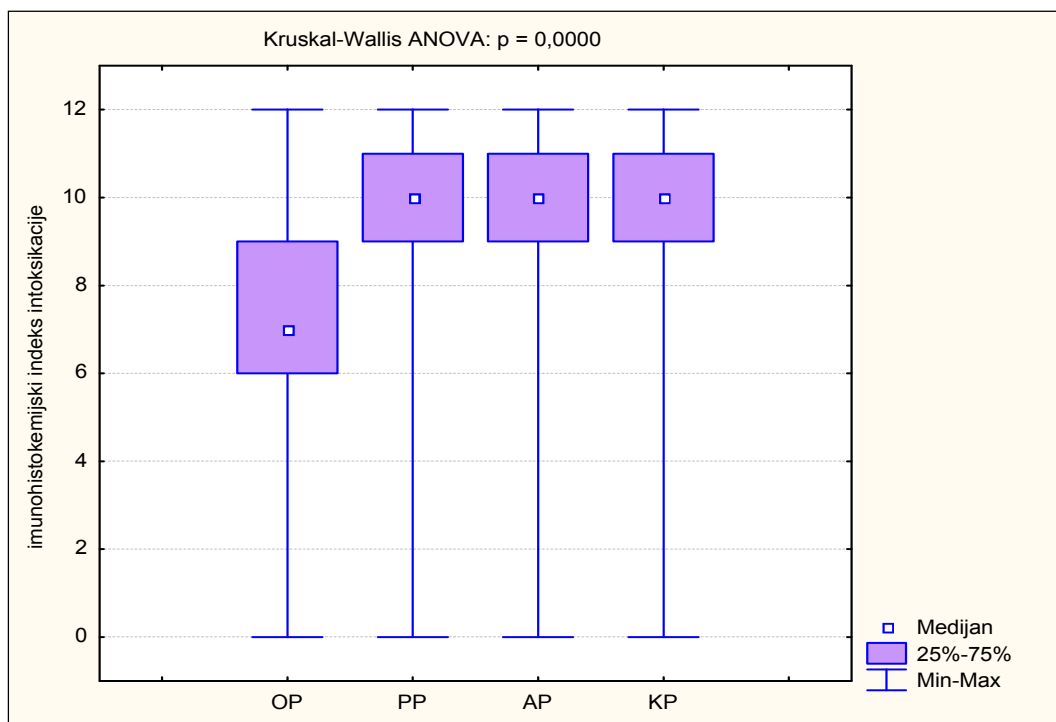
Tablica 22. Usporedba imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP) po skupinama OP, PP, AP, KP.

Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)	OP	PP	AP	KP	OP vs PP	PP vs AP	AP vs KP
niski	5 (5,9%)	4 (6,0%)	6 (8,6%)	6 (7,9%)	0,0000	0,8089	0,9686
srednji	54 (64,3%)	10 (14,9%)	9 (12,9%)	9 (11,8%)			
visoki	25 (29,8%)	53 (79,1%)	55 (78,5%)	61 (80,3%)			
IHIP (prosjeak)	7 (0 – 12)	10 (0 – 12)	10 (0 – 12)	10 (0 – 12)	0,0000	0,9387	0,8245

Legenda: OP – roditelj, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelj ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelj puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelj, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

umjereno izraženi SI
naglašeno izraženi SI

Izračun medijana daje još zorniji prikaz međusobnih odnosa i utjecaja duhanskog dima. IHIP-medijan skupine OP iznosi 7, dok je u svih ostalih skupina 10, što odgovara srednjem odnosno visokom IHIP-u. Ovaj odnos dodatno je potvrdila statistička analiza koja je pokazala značajnu razliku medijana pri usporedbi skupine OP s PP ($p=0,0000$), ali ne i pri usporedbi PP s AP ($p=0,9387$) i AP s KP ($p=0,9686$) (Tablica 22, Slika 12).



Slika 12. Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP) obzirom na pušačku kategoriju majke

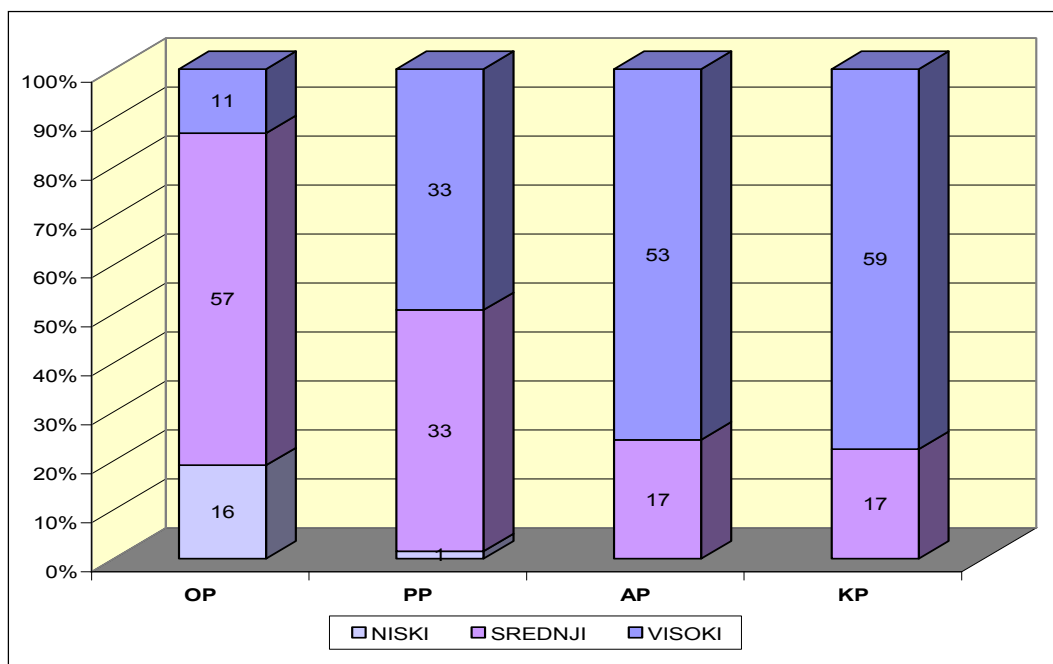
5.7. Intoksikacijski indeks posteljice (IIP)

Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) je nastao kao rezultat zbroja morfološkog indeksa posteljice (MIP) i imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP), te se analogno MIP i IHIP, promatrao kroz niski, srednji i visoki stupanj intoksikacije posteljice (Tablica 23, Slika 13).

Tablica 23. Intoksikacijski indeks posteljice (IIP).

Intoksikacijski indeks posteljice (IIP)	OP	PP	AP	KP	p
niski	16 (19,1%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,0000
srednji	57 (67,8%)	33 (49,2%)	17 (24,3%)	17 (22,4%)	
visoki	11 (13,1%)	33 (49,2%)	53 (75,7%)	59 (77,6%)	
IIP (medijan)	42 (16 – 78)	60 (27 – 80)	70 (40 – 84)	68 (41 – 84)	0,0000

Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike



Slika 13. Ocjena Intoksikacijskog indeksa posteljice (IIP) obzirom na pušačku kategoriju majke; Hi-kvadrat test: $p = 0,0000$.

Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) pokazao je statistički značajnu povezanost ($p=0,000$) s kategorijom pušenja, na način da se niski i srednji IIP najčešće nalazio u posteljica skupine OP odnosno u 19,1% i u 67,8% posteljica, dok je visoki IIP bio najčešće izražen u posteljica skupine KP (Tablica 23).

Uspoređivanje skupina pokazalo je kako posteljice **skupine OP** većinom karakterizira srednji IIP u 67,8% posteljica, **skupinu PP** karakterizira jednak udio posteljica sa srednjim i visokim IIP ili 49,2%, dok su posteljice **skupina AP i KP** prepoznatljive većinom po visokom IIP s učestalošću od 75,7% odnosno 77,6% (Tablica 23).

Statistička analiza izraženosti IIP među skupinama, pokazala je značajnu razliku ($p=0,0000$) između posteljica neizloženih duhanskom dimu (skupina OP) u odnosu na posteljice koje su bile izložene duhanskom dimu neovisno o načinu izlaganja (skupine PP, AP i KP). Također se pokazala i statistički značajna razlika ($p=0,019$) između posteljica koje su izložene samo pasivnom pušenju (skupina PP) u odnosu na posteljice izložene aktivnom pušenju i/ili kombiniranoj intoksikaciji (skupine AP i KP). Međutim nije utvrđena statistički značajna razlika između posteljica izloženih samo aktivnom pušenju i kombinaciji aktivnog i pasivnog pušenja (AP s KP, $p=0,7842$) (Tablica 24).

Tablica 24. Usporedba Intoksikacijskog indeksa posteljice (IIP) između skupina OP, PP, AP i KP.

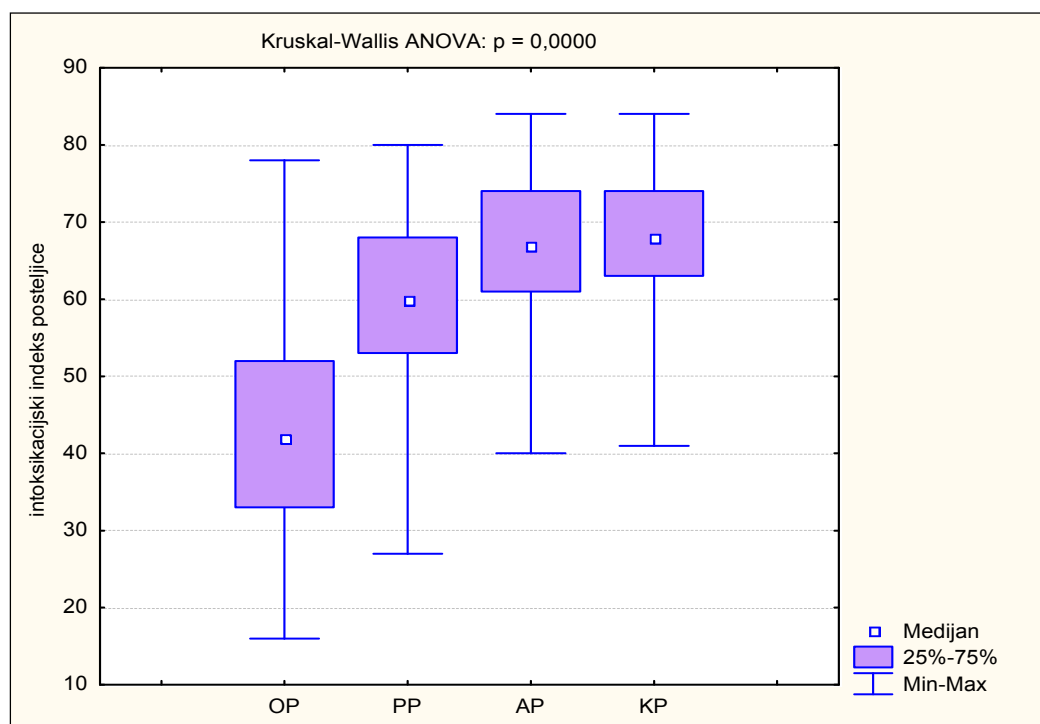
Ispitanice	OP	PP	AP	KP	OP vs PP	PP vs AP	AP vs KP
Broj	84	67	70	76	p	p	p
INTOKSIKACIJSKI INDEKS POSTELJICE (IIP)							
niski	16 (19,1%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,0000	0,0019	0,7842
srednji	57 (67,8%)	33 (49,2%)	17 (24,3%)	17 (22,4%)			
visoki	11 (13,1%)	33 (49,2%)	53 (75,7%)	59 (77,6%)			
IIP (prosjeak)	42 (16 – 78)	60 (27 – 80)	70 (40 – 84)	68 (41 – 84)	0,0000	0,0004	0,7449

Legenda: OP – roditelja, partner i ostali ukućani su nepušači ; PP – roditelja ne puši, partner i/ili ukućani ne puše; AP – roditelja puši, partner i/ili ukućani ne puše; KP – roditelja, partner i/ili ukućani puše; p – statistička značajnost razlike

umjereno izraženi SI

naglašeno izraženi SI

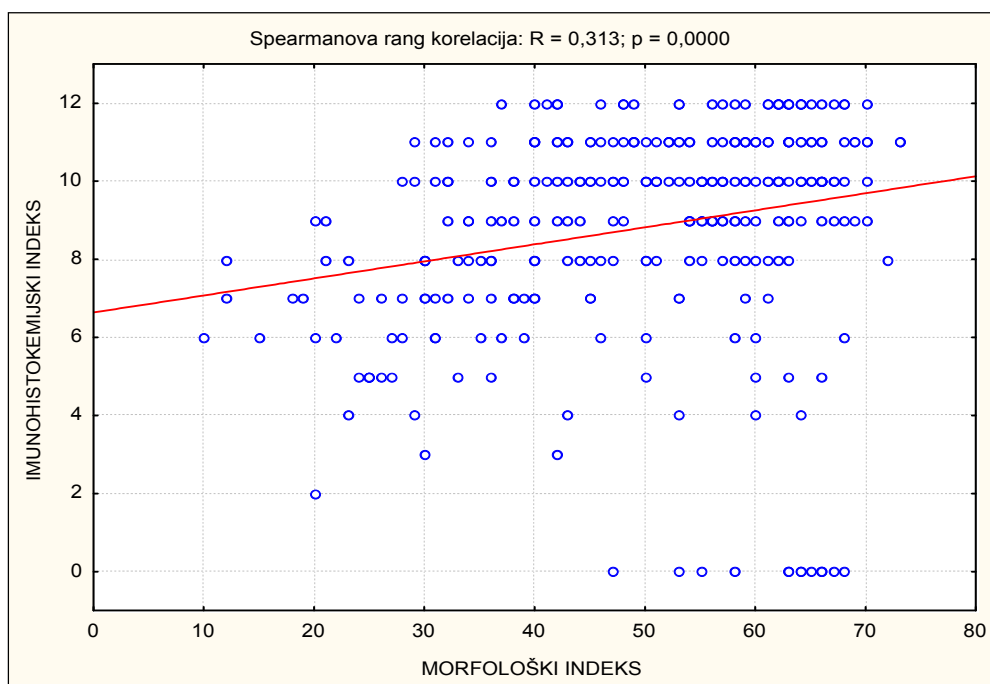
Analiza medijana pokazala je kako **skupina OP i PP** pokazuju **srednji**, **skupina AP i KP visoki** IIP. Međutim dok je medijan skupine OP bliži donjoj granici, medijan skupine PP je na samoj gornjoj granici srednjeg razreda intoksikacije. Ovakav raspored medijana odraz je specifičnog odnosa niskog, srednjog i visokog razreda intoksikacije među skupinama odnosno sugerira gravitiranje skupine OP prema niskom stupnju intoksikacije posteljica duhanskim dimom, dok skupina PP gravitira prema visokom stupnju intoksikacije duhanskim dimom (Slika 14).



Slika 14. Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) obzirom na pušačku kategoriju majke.

5.8. Korelacija MIP i IHIP

Ispitivanjem međusobnih odnosa razrađenih indeksa, pokazalo se da su rezultati MIP u korelaciji s rezultatima IHIP. Drugim riječima MIP i IHIP pokazuju pozitivnu korelaciju s visokim stupnjem koeficijenta korelacije $R=0,313$, $p=0,0000$ (Slika 15).

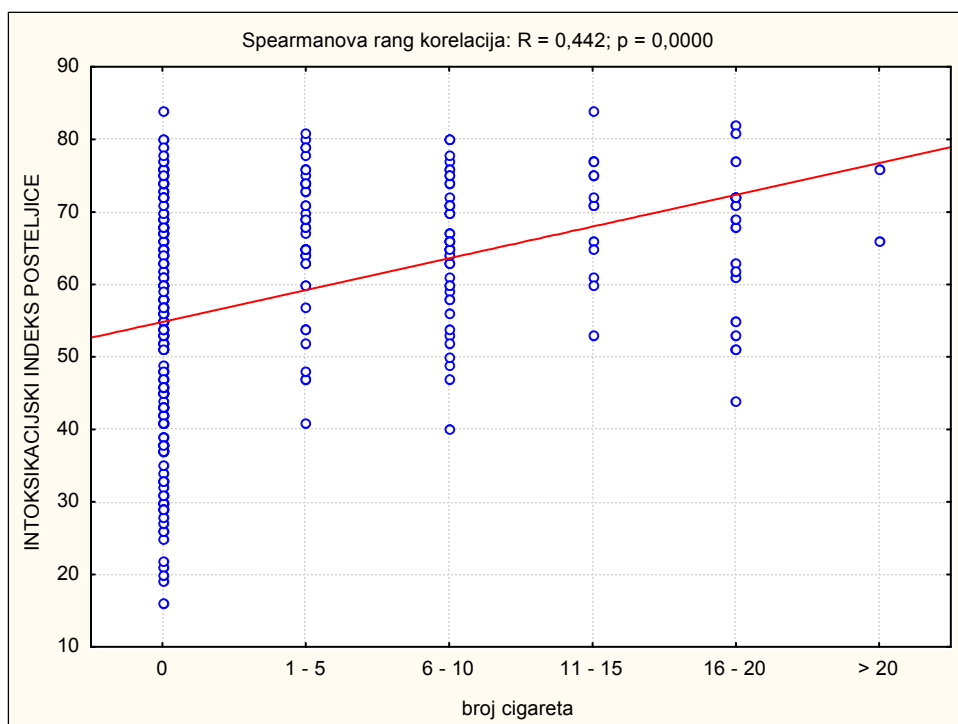


Slika 15. Povezanost MIP i IHIP s obzirom na intoksikaciju posteljice duhanskim dimom.

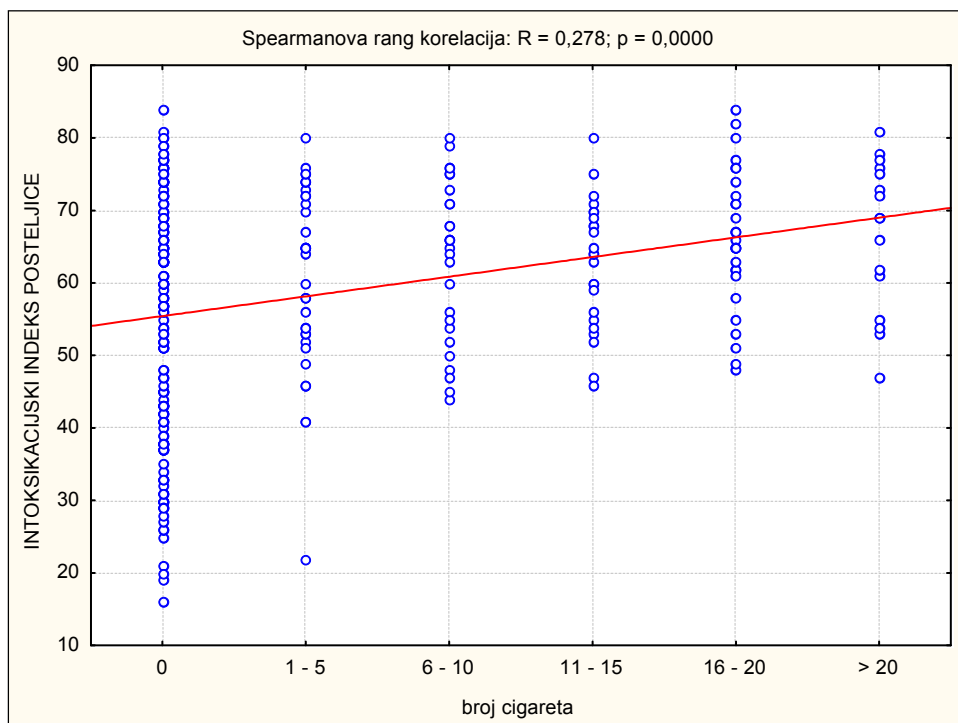
5.8. Korelacija IIP i izloženosti posteljice duhanskom dimu

Relevantnost intoksikacijskog indeksa posteljice (IIP) kao pokazatelja intoksikacije posteljice duhanskim dimom dokazana je:

1. pozitivnom korelacijom između IIP i broja cigareta koje majka popuši tijekom trudnoće, s izraženim visokim koeficijentom korelacije $R=0,442$, $p=0,0000$ (Slika 16).
2. pozitivnom korelacijom između IIP i broja cigareta koje partner popuši tijekom trudnoće, s izraženim visokim koeficijentom korelacije $R=0,278$, $p=0,0000$ (Slika 17).



Slika 16. Povezanost IIP s brojem cigareta koje majka puši u trudnoći.



Slika 17. Povezanost IIP s brojem cigareta koje partner trudnice puši uz nju tijekom trudnoće.

5.9. Utjecaj broja popušanih cigareta na MIP, IHIP i IIP

U Tablici 25. je prikazano kako na MIP, IHIP i IIP statistički značajno utječe izloženost duhanskom dimu, bez obzira radilo se o trudnici, partneru ili nekom od ukućana koji uz nju puši, ali ne i koliko je izložena.

Tablica 25. Ispitivanje utjecaja broja cigareta koje popuši trudnica, partner i/ili ukućani MIP, IHIP i IIP.

Parovi varijabli	Spearmanova Rang Korelacija*			
	N	R	t(N-2)	p
M –BR.C. –TR & MIP	290	0,402456	7,576480	0,000000
M –BR.C. –TR& IHIP	290	0,211277	3,725176	0,000234
M –BR.C. –TR& IIP	290	0,401258	7,549581	0,000000
P –BR.C. & MIP	290	0,283078	5,086536	0,000001
P –BR.C. & IHIP	290	0,176098	3,082996	0,002242
P –BR.C. & IIP	290	0,278492	4,997131	0,000001
U –BR.C. & MIP	290	0,234895	4,164629	0,000041
U –BR.C. & IHIP	290	0,065483	1,130938	0,258994
U –BR.C. & IIP	290	0,220324	3,892643	0,000122

legenda: *u analizu su uključeni i oni koji ne puše, dakle broj cigareta je 0

M-BR.C.-TR – broj cigareta koje popuši majka tijekom trudnoće

P-BR.C – broj cigareta koje popuši partner

U-BR.C. – broj cigareta koje popuše ukućani

Ako **majka** puši u trudnoći (skupina AP i KP), sva tri indeksa MIP, IHIP i IIP su statistički značajno viša nego ako ne puši u trudnoći (Mann-Whitney U test).

Ako analiziramo cijelu skupinu majki (skupina OP, PP, AP, KP) s obzirom na broj popušanih cigareta (klasificiran kao 0 = niti jedna cigareta; 1 = 1 – 5 cigareta, 2 = 6 – 10 cigareta, 3 = 11 – 15 cigareta, 4 = 16 – 20 cigareta, 5 = više od 20 cigareta), onda postoji statistički značajna povezanost kategorije broja cigareta i sva tri indeksa MIP, IHIP i IIP odnosno vidljiva je pozitivna korelacija između broja cigareta i visine indeksa. (Spearmanova Rang Korelacija). Na tu povezanost najviše je utjecala kategorija 0 (Slika 17).

Ako **partner** puši uz trudnicu, sva tri indeksa MIP, IHIP i IIP su statistički značajno viša nego ako ne puši uz trudnicu (Mann-Whitney U test).

Ako analiziramo cijelu skupinu partnera (i one koji puše uz trudnicu i one koji ne puše uz trudnicu odnosno sve partnere po skupinama OP, PP, AP i KP) s obzirom na broj partnerovih popušanih cigareta (broj popušanih cigareta klasificiran kao 0 = niti jedna cigareta; 1 = 1 – 5 cigareta; 2 = 6 – 10 cigareta; 3 = 11-15 cigareta; 4 = 16 – 20 cigareta; 5 = više od 20 cigareta), onda postoji statistički značajna povezanost kategorije broja cigareta i sva tri indeksa MIP, IHIP i IIP odnosno postoji pozitivna korelacija između indeksa i broja popušanih partnerovih cigareta. (Spearmanova rang korelacija). Na tu povezanost najviše je utjecala kategorija 0.

Drugim riječima indeksi su viši kod žena čiji partneri puše uz njih (skupine PP, KP), ali nisu povezani s brojem cigareta koje partner popuši, osim MIP koji ovisi o broju popušanih cigareta.

Ako **ukućani** puše uz trudnicu, sva tri indeksa MIP, IHIP i IIP su statistički značajno viša nego ako nitko ne puši uz trudnicu (Mann-Whitney U test).

Ako analiziramo cijelu skupinu ukućana (i one koji puše uz trudnicu i one koji ne puše uz trudnicu) s obzirom na broj popušanih cigareta od strane ukućana (broj popušanih cigareta klasificiran kao 0 = niti jedna cigareta; 1 = 1 – 5 cigareta.... 5 = više od 20 cigareta), onda postoji statistički značajna povezanost kategorije broja cigareta s MIP i IIP odnosno postoji pozitivna korelacija između broja cigareta i visine indeksa. (Spearmanova rang korelacija). Na tu povezanost najviše je utjecala kategorija 0. IIP ne ovisi o broju cigareta koje ukućani popuše uz trudnicu.

Drugim riječima indeksi su viši kod žena čiji ukućani puše uz njih, ali nisu povezani s brojem cigareta koje ukućani popuše.

U tablici 26. nalazi se prikazan odnos između broja popušanih cigareta koje popuši trudnica, partner i/ili ukućani u odnosu na skalarne indekse metalotioneina i HSP-70 izveden Testom Spearmanove rang korelacije.

Tablica 26. Ispitivanje utjecaja broja cigareta koje popuši trudnica, partner i/ili ukućani na izražajnost HSP-70 i metalotioneina.

Parovi varijabli	Spearmanova Rang Korelacija*			
	N	R	t(N-2)	p
M –BR.C. –TR & SI HSP-70	290	0,212550	3,748674	0,000214
M –BR.C. –TR& SI Metalotionein	290	0,155109	2,705851	0,007207
P –BR.C. & SI HSP	290	0,214973	3,793471	0,000180
P –BR.C. & SI Metalotionein	290	0,113444	1,967758	0,050026
U –BR.C. & SI HSP	290	0,127420	2,213967	0,027591
U –BR.C. & SI Metalotionein	290	0,016711	0,288037	0,773519

legenda: *u analizu su uključeni i oni koji ne puše, dakle broj cigareta je 0

M-BR.C.-TR – broj cigareta koje popuši majka tijekom trudnoće

P-BR.C – broj cigareta koje popuši partner

U.BR.C. – broj cigareta koje popuše ukućani

SI HSP-70 – Skalarni indeks izražajnosti (difuznost+intenzitet) HSP-70

SI Metalotionein - Skalarni indeks izražajnosti (difuznost+intenzitet) Metalotioneina

Na izražajnost **HSP-70** prikazanu u obliku skalarnog indeksa (zbroy difuznosti i intenziteta imunohistokemijske reakcije) utječe činjenica da majka ili netko (partner, ukućani) uz nju puši, ali ne i koliko puši.

Na izražajnost **metalotioneina** prikazanu u obliku Skalarnog indeksa (zbroy difuznosti i intenziteta imunohistokemijske reakcije) utječe činjenica da majka puši, ali ne i koliko puši, dok pušenje partnera i ukućana kao ni broj cigareta koje popuše ne utječe na indeks metalotioneina.

Iz prethodnog proizlazi da je HSP-70 osjetljiviji pokazatelj izloženosti posteljica štetnom učinku duhanskog dima od metalotioneina.

5. RASPRAVA

6.1. Opći podaci

Statistička analiza općih podataka omogućila je prepoznavanje skrivenih značajki pojedinih skupina te njihovo diferenciranje u odnosu na ostale rodilje. Izdvaja se skupina OP kao skupina najstarijih i najobrazovanijih rodilja, s najvećim postotkom zaposlenih i udatih rodilja, koje su imale najviše spontanih pobačaja, problema sa začećem i očuvanjem sadašnje trudnoće, dok je istovremeno to skupina koja je najrjeđe odabirala namjerni pobačaj kao metodu planiranja obitelji. Radi se o rodiljama koje se gotovo deklarativno izjašnjavaju kako informacija o pušenju nema dovoljno u medijima, dok je manje od polovice dobilo informaciju o štetnosti pušenja od svog ginekologa. Treba podsjetiti kako je to skupina koja ne samo da nije pušila tijekom trudnoće, nego nikada nije pušila niti prije trudnoće.

Iz navedenog vrijedi posebno prokomentirati činjenicu da je gotovo 8,3% rodilja iz ove populacije imalo problema sa začećem, očuvanjem trudnoće, ali i najveći postotak spontanih pobačaja (čak 17,9%) što je ujedno i najviši postotak iskazan u odnosu na ostale ispitivane skupine u svezi s ovim problemom. S jedne strane, veća učestalost se može protumačiti s višom dobi rodilja kada se i može očekivati ovakva problematika, s obzirom da se radi o rasponu rodilja do 44 godine starosti u skupini. No s druge strane treba uzeti u obzir da je većina ispitanica ipak anketirana u Klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu, specijaliziranoj ustanovi za navedenu problematiku, te je uobičajeno da se rodilje s takvim tegobama do kraja trudnoće i prate u kliničkoj ustanovi. Koliko god statistički relevantan, taj podatak može biti zapravo barem u dijelu umjetno povećan iz navedenih razloga.

Druga informacija koja iskače iz stereotipa jest činjenica da su iste rodilje u čak 48,8% navele kako nisu bile informirane od svog ginekologa o štetnosti pušenja što je zanimljivo jer s druge strane rodilje skupine AP i KP navode čak u 71,4% i 77% slučajeva kako su istu informaciju dobile. Prvo objašnjenje koje se nameće jest da su rodilje iz skupine OP nezadovoljne informiranjem o pušenju kako u medijima tako i s informacijama dobivenim od ginekologa, zato jer su kao nepušači senzibilizirane na problem pušenja oko sebe, a s druge strane su obrazovanije pa su i bolje upoznate

sa štetnostima pušenja, te su vjerojatno očekivale više informacija od minimalnih koje su im bile ponuđene. Druga mogućnost jest da ginekolog nije držao potrebitim objašnjavati o štetnostima pušenja nepušačima, što su roditelje očito procijenile nemarom. Naime, upravo zato što su nepušači, možda su manje informirane o štetnosti pasivnog pušenja po svoje zdravlje ali i zdravlje ploda, pa je primarni ginekolog odnosno ginekolog koji je pratio trudnoću trebao biti upravo prva osoba koja im je trebala skrenuti pozornost na štetnosti izlaganja duhanskom dimu tijekom trudnoće.

Na suprotnoj strani zamišljenog stupnja izloženosti duhanskom dimu nalazi se skupina KP odnosno roditelje koje puše kao i njihov partner odnosno ukućani. Radi se o roditeljama znatno mlađe životne dobi u prosjeku, ali ne i najmlađe. Naime, roditelje skupine KP su najneobrazovanije s najmanjim postotkom visoko obrazovanih roditelja, ali s najvećim postotkom nepismenih i niskoobrazovanih, s najnižim postotkom zaposlenih među ispitanicama, te s najvećim udjelom neudanih žena i visokim postotkom namjernih pobačaja. Niti jedna roditelja nije navela probleme začeća, ali su navodile spontane pobačaje i probleme očuvanja trudnoća. Nadpolovična većina ovih roditelja smatra kako ima dovoljno informacija o štetnosti pušenja u medijima, dok ih je čak 77,3% tu informaciju dobilo od svog ginekologa.

Skupina AP su roditelje koje puše, ali ne puše njihovi partneri niti ukućani. To su roditelje po dobi odmah iza skupine OP, pretežito srednje stručne spreme, pretežito zaposlene i udate, sa znakovito najvećim brojem roditelja koje su se odlučile na namjerni pobačaj u ispitivanoj populaciji (čak 11,4%), ali s najnižim postotkom spontanih pobačaja i minimalnim problemima začeća. Po mišljenju čak 62,3% ispitanica ove skupine informacija o štetnosti pušenja ima dovoljno u medijima, a same su o istima u 71,4% informirane od strane ginekologa.

Skupina PP je skupina roditelja koje ne puše, ali su zbog pušenja partnera i/ili ukućana izložene pasivnom pušenju. Radi se o skupini najmlađih roditelja koje su pretežito srednje stručne spreme i pretežito zaposlene iako su po broju nezaposlenih odmah iza skupine KP, s najvišim postotkom neudatih (19%), te zanimljivo najmanjim postotkom namjernih pobačaja, u svega 1,5%, ali s relativno visokim postotkom spontanih pobačaja, minimalnom učestalošću problema začeća i nešto većom

učestalošću problema očuvanja trudnoće. To su ujedno rodilje koje su odmah iza skupine OP po negativnom stavu o dostupnosti informacija u medijima o štetnosti pušenja. Naime njih čak 61,9% misli da ih nema dovoljno, dok je informacije o štetnosti pušenja gotovo polovica dobila od svog ginekologa.

U svakom slučaju neinformiranost rodilja zbog propusta ginekologa, ali i manjka edukativnih informacija o štetnosti pušenja, svakako snosi dio odgovornosti za visoku učestalost pušenja tijekom trudnoće u hrvatskoj populaciji.

Dakle, svakako je intrigantan nesklad između činjenice kako skupina rodilja koja puši smatra da ima dovoljno informacija u medijima, dok skupina koja ne puši pretežito smatra kako ih nema dovoljno. Zapravo je zanimljivo kako su upravo rodilje koje su zadovoljne informiranjem o štetnosti pušenja tijekom trudnoće bile i iznimno dobro informirane od strane svog ginekologa o štetnosti pušenja. Pitanje koje se samo po sebi nameće je zašto su ipak nastavile pušiti tijekom trudnoće. Odgovor zadire u psihosocijalnu analizu kako pojedinca, tako i današnjeg društvenog okruženja u kojem ispitanice žive, te stoga nadilazi temu studije, no s druge strane propituje kvalitetu informacija koju rodilje dobivaju od ginekologa u smislu jasnoće i uvjerljivosti interpretacije koja svakako proizlazi iz osobnog primjera, kao i ustrajnosti ginekologa da opetovanim razgovorima o štetnosti pušenja utječe na promjenu navike pušenja u majke i njezinih ukućana. Druga razina problema su mediji koji uopće ne signaliziraju niti osnovne upozoravajuće ishode po majku i plod u uvjetima izlaganja duhanskom dimu, a o blokovima edukativnih emisija kojima bi se trebala, slikovito govoreći, bombardirati populacija rodilja, nema niti govora. Prema tome, Ministarstvo zdravlja kao najviša instanca u zemlji koja bi trebala kreirati politiku zaštite trudnica i njihovog ploda o štetnosti pušenja tijekom trudnoće, snosi svakako značajan dio odgovornosti za zatečeno stanje u ispitanjoj populaciji.

Naime, danas WHO, na temelju desetljeća praćenja fenomena pušenja i njegovih posljedica po populaciju, pušenje smatra 21. epidemijom koja je ušla u svoju IV. fazu u visoko razvijenim zemljama, dok je u niskorazvijenim i srednjerazvijenim zemljama u III. fazi koju karakterizira maksimum konzumacije duhanskih proizvoda s tek početkom razvoja posljedica po zdravlje u populaciji. S druge strane značajka IV. faze je upravo obrnuta situacija: iako se smanjio broj osoba koje aktivno ili pasivno

konzumiraju duhanske proizvode u odnosu na III. fazu, značajno je veći broj osoba koje pate od posljedica konzumacije. Drugim riječima, s obzirom da Republiku Hrvatsku karakterizira III. faza duhanske epidemije, glavnina obolijevanja od posljedica izlaganja duhanskom dimu tek će slijediti u idućim desetljećima, što će astronomski opteretiti zdravstvo kao i državne proračune.

American Cancer Society u četvrtoj ediciji Tobacco Atlasa, iznosi zastrašujuće podatke: milijarda ljudi puši cigarete, dok će pola od njih preminuti zbog pušenja. Naime, svake godine oko šest milijuna ljudi u svijetu premine uslijed izloženosti duhanskom dimu, pri čemu je oko pet milijuna aktivnih pušača, dok je oko 600 000 nepušača koji pasivno udišu duhanski dim. Očekuje se, kako će godišnje, do 2030. preminuti oko 8 miliona ljudi zbog pušenja i to pretežito u nisko i srednje razvijenim zemljama. Porast smrti uslijed izlaganja duhanskom dimu najbolje predočava slijedeći podatak: smatra se kako je u 20. stoljeću duhanski dim bio uzročnikom smrti oko 100 miliona ljudi, dok će se u 21. stoljeću taj broj popeti na 1 milijardu. Kolateralni učinak duhana očituje se kroz činjenicu kako je jedini od četiri čimbenika rizika, uz nezdravu prehranu, manjak tjelesne aktivnosti i konzumiranje alkohola, prisutan u sve četiri najčešće bolesti moderne civilizacije: kardiovaskularnim bolestima, dijabetesu, karcinomu, kroničnim respiratornim bolestima. Isti autori u nastojanju osviještavanja populacije o štetnosti pušenja navode posljednje podatke o čak 7000 različitih kemikalija koje se nalaze u duhanskom dimu, od kojih su na stotine toksične, a njih minimalno 69 kancerogene. Radi se o tvarima koje su apsolutno zabranjene za uporabu u svim proizvodima koji se unose u organizam ili dolaze u kontakt s kožom (npr. prehrambena industrija, kozmetička industrija), kao što je npr. aceton koji je sastavni dio odstranjivača boje, acetilen (tvar za zavarivanje), arsen (otrov za mrave), benzen (napalm), butan (upaljač cigareta), kadmij (baterije), ugljikov monoksid (ispušni plin automobila), DDT (insekticid), formaldehid (tekućina za balzamiranje), vodikov cijanid (tvar za izvršenje smrtne kazne), olovo (olovni benzin), metanol (gorivo za rakete), nikotin (otrov za žohare), fenol (dezinficijens za zahodske školjke), radioaktivni polonij - 210 (nuklearno oružje), toluen (industrijski razrijeđivač), vinil klorid (plastika) i dr.⁸⁶

Prema Davidu Moyeru autoru web-stranice The Tobacco Reference Guide stvari su dovedene do apsurdna tijekom proteklog stoljeća. Naime, 1990. Perrier je zaustavio

izdavanje boca vode jer su u jednoj seriji pronađeni tragovi benzena. No istovremeno u svakoj kutiji cigareta ima više benzena nego u stotini „kontaminiranih“ Perrierovih boca vode. 1988. američka vlada zaustavila je uvoz čileanskog grejpa zbog male količine cijanida pronađene u dva komada voća. Istovremeno deset puta više cijanida ima u dva ispuha cigaretnog dima nego što je količina pronađena o inkriminiranom voću. Liste kemijskih sastojaka koje se dodaju duhanu pri izradi cigareta radi poboljšanja okusa su tajne. Svega tri zemlje u svijetu, Canada, Thailand i Massachussettes, zakonom su obvezale duhansku industriju otkriti imena aditiva. Dva od tih 700 aditiva su sklerol, koji uzrokuje epi-napade u laboratorijskih štakora, i drugi, etilfluorat, koji je tijekom tridesetih godina prošlog stoljeća istraživao kao mogući kemijski ratni otrov. Iako se aditivi nalaze u duhanskom dimu u malim koncentracijama, koje se obično uspoređuju kao ništavne u odnosu na industrijsko zagađenje okoliša, treba znati kako duhanski dim sadrži 13 milijardi čestica po kubičnim centimetru, što je 10 000 puta veća koncentracija nego u ispušnom dimu automobila koji juri po autocesti. Zbog gnojenja tla duhanskih nasada s visokim udjelom fosfata koji su prirodno kontaminirani radioaktivnim polonijem, prosječni pušač će tijekom godine dana ozračiti bronhalni epitel s 8 do 9 rema, što je ekvivalentno dozi radijacije od 250 do 300 RTG-snimki prsnoga koša provedenih u godini dana.⁸⁷

Imajući sve prethodno u vidu, rezultati dobiveni studijom postaju razumljiviji, a uzročno-posljedična veza između pušenja i promjena na posteljici s mogućim efektom na fetus, novorođenče pa čak i epigenetske promjene budućih populacija, postaje značajnija i objašnjivija, kako znanstvenicima tako i laicima. Posebno pitanje koje se nikako ne može zaobići jest slijedeće: nosi li populacija žena koje puše tijekom trudnoće (i ne odustane nakon otkrivanja trudnoće) značajke koje ih izdvajaju iz populacije trudnica? Istraživanja su pokazala kako je prevalencija trudnica koje puše tijekom cijele trudnoće različita u svakoj državi, pa tako u Australiji iznosi oko 14,5%, iako podskupina ispitanica Aborignskog porijekla puši čak u 49,3% slučajeva, u SAD-u je taj broj bio 2005. godine 22,5% dok se 2014. bilježi pad na 10,2%, u Kanadi 19%, u Engleskoj između 12-14%, dok je najniži u Švedskoj gdje se kreće oko 5%.⁸⁸⁻⁹¹ Postoji jasna povezanost između sociodemografskih značajki i pušenja tijekom trudnoće. Studija Fenercioglu i sur. pokazala je jedinu bitnu razliku u godinama školovanja, što je u skladu s rezultatima ove studije, pri čemu obrazovanje

trudnice imaju manju učestalost pušenja u trudnoći.⁹² Međutim većina sociodemografskih istraživača ističe kako je odabir pušenja trudnice tijekom trudnoće ipak znatno kompleksniji problem koji proizlazi iz dobi trudnice, statusa zaposlenosti, ekonomskog statusa, rasne pripadnosti, edukacije, te dostupnost prenatalne skrbi.^{93,94} PRAMS-ova studija došla je do sličnih spoznaja: majke koje puše tijekom trudnoće su češće mlađe od 25 godina, bjelačke populacije (non-Hispanic white), imaju manje od 12 godina edukacije, neudate, godišnji dohodak je manji od 15.000 američkih dolara, pothranjene su, s neželjenom trudnoćom, prvorotke, koje su započele znatno kasnije s prenatalnom skrbi.⁸⁹ Drugi autori također ističu kako je pušenje tijekom trudnoće naglašeno češće u mladih žena i doseže čak do 37% u maloljetničkoj trudnoći⁸⁸ što je u skladu s rezultatima prikazanim u ovoj studiji. Posebno je zanimljiv navod Goodwin RD i sur. kako je pušenje u trudnoći pokazatelj mentalne bolesti odnosno da čak 50% trudnica koje puše tijekom trudnoće imaju neki oblik poremećaja mentalnog zdravlja.⁹⁵

Izuzev posljednje navedenog, jer status mentalnog zdravlja nije bio tema ispitivanja, rezultati ove studije su u skladu s navedenim sociodemografskim ispitivanjima. Iako se u svim ispitivanim kategorijama nije dobila statistički značajna razlika između sociodemografskih značajki nepušačica i pušačica, postoji jasna naznaka trendova koji govore u prilog citiranim studijama. Međutim, posebno se u ispitanica iz ove studije ističe jedna zanimljiva razlika, ili čak trend, a koji je objašnjiv upravo statusom Hrvatske koja je još uvijek zapela u III. stadiju epidemije pušenja. Naime, značajan udio visokoobrazovanih ne tako mladih žena aktivno puši tijekom cijele trudnoće, što može biti posljedica post-modernističkih i post-feminističkih trendova u kojem se oslobođenje i osviještenje žene izražava kroz privilegiju pušenja. Visoko razvijene zemlje Europe, prije svega Švedska, te SAD, dvadesetogodišnjom kampanjom o štetnosti pušenja ogolile su koristoljublje duhanske industrije koje se skrivalo iza tog trenda do devedesetih godina prošlog stoljeća, dok su hrvatske trudnice u drugom desetljeću 21. stoljeća zapele u vakuumu potrebe za dokazivanjem svoje osobnosti i nepostojanjem potrebe za dodatnom edukacijom kojoj u značajnoj mjeri pridonosi država svojom neinventivnošću te manjkom vizionarstva.

6.2. Novorođenački pokazatelji

Usporedbom skupina niti jedan od ispitivanih neonatoloških parametara (način poroda, porođajni stav, lijekovi, komplikacije poroda, komplikacije babinja, spol djeteta, gestacijska dob, dužina, težina, PI, BMI, Apgar) nije pokazao statistički značajnu razliku koji bi u tom slučaju mogao kliničaru ukazati na izlaganje ploda duhanskom dimu tijekom intrauterinog razdoblja. No tendencija statističke značajnosti težine i dužine novorođenčeta po skupinama, te osobito usporedbom raspona istih parametara između dviju krajnjih skupina OP i KP, dakle skupine gdje roditelje nisu bile izložene djelovanju duhanskog dima i roditelje koje su bile maksimalno izložene djelovanju duhanskog dima, dobivaju se podatci koji ukazuju kako bi kod većeg uzorka isti mogli pokazivati statistički značajnu razliku. Naime, iako je prosjek tjelesne dužine u svim skupinama jednak (51 cm), rasponi se bitno razlikuju pa je raspon dužine u skupini OP od 46 do 55 cm, dok je raspon dužine novorođenčadi skupine KP od 44 do 54 cm što je ujedno i najmanja dužina među novorođenčadi promatranih skupina. Težina se pokazuje još zanimljivijim parametrom. Dok je prosjek težine novorođenčadi u skupinama OP i KP 3500 ili više grama, u preostale dvije skupine je za preko 100 g manji. Međutim raspon tjelesnih težina izmjerenih u novorođenčadi je znatno raznolikiji, dok je najmanja tjelesna težina u skupini OP 2730 g, u skupini KP je čak 2250 g.

Iako u istraživanju nije prikazana statistički značajna razlika za niti jedan od uspoređivanih parametara, tendencija pada tjelesne težine s obzirom na razinu izloženosti duhanskom dimu u skladu je s rezultatima prethodno spomenutih studija u kojima se tjelesna težina novorođenčeta pokazala kao najstalniji i najosjetljiviji parametar koji podražava izloženost aktivnom ili pasivnom pušenju⁸⁻¹⁵. Također treba imati u vidu kako su sve posteljice bile terminske posteljice, a roditelje bez značajnih zdravstvenih komplikacija, za razliku od većine studija koje nisu uzimale u obzir punu gestacijsku dob. Stoga je ovom studijom dobiveni rezultat tim važniji jer ukazuje na činjenicu da je broj ispitanica po skupinama veći, vjerojatno bi značajnost bila dosegnuta. Značajnost tjelesne težine kao osjetljivog parametra prepoznala je Ward i sur. u studiji kojom je dokazala kako se ona značajno smanjuje kod novorođenčadi izloženoj aktivnom ili pasivnom pušenju majke tijekom intrauterinog života, za razliku od majki nepušačica. Radilo se o studiji od 18,819 novorođenčadi, što govori u prilog

tezi o relativno malom uzorku u ovoj studiji. Zanimljivo je kako je u studiji Ward i sur. medijan sniženja tjelesne težine novorođenčadi majki koje su aktivno pušile bio 146 g (122 g do 171 g), dok je novorođenčad majki koje su bile izložene pasivnom pušenju karakterizirao medijan smanjenja tjelesne težine od 36 g (5g do 67g), što je zapravo vrlo blisko rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.⁹⁶

Koliko aktivno i/ili pasivno pušenje majke utječe na intrauterini zastoje rasta fetusa (IUGR) s posljedičnim smanjenjem tjelesne težine novorođenčeta, izvrsno se vidi iz studije Dejmeek i sur.⁹⁷ koja je pokazala kako prekid aktivnog ili pasivnog pušenja u ranoj gestacijskoj dobi povećava tjelesnu težinu pri rođenju za prosječno 200 g u odnosu na majke koje su nastavile izlagati fetus aktivnom ili pasivnom pušenju do kraja trudnoće. Najveća razlika je očekivano u majki koje su pušile više od 10 cigareta dnevno.

Način života majki pušačica ne prestaje utjecati na novorođenče danom njegovog dolaska na svijet, već se prolongira na djetinjstvo, te osobito osjetljivu dojenačku dob ali sad u obliku pasivnog pušenja kojemu je dojenče izloženo. Blizzard i sur.⁹⁸ iznosi kako se broj hospitalizirane djece zbog respiratornih bolesti smanjio za 56%, 73% i 95% u ovisnosti o tome je li majka pušila u drugoj sobi i je li odgodila pušenje dok doji ili hrani dojenče. Rezultati Leung M. i sur.⁹⁹ u skladu su sa prethodnima; autori navode rezultate studije izvedene na 8327 novorođenčadi koji su pokazali kako je pušenje majke na radijusu od 3 m od novorođenčeta bilo dovoljno da se broj hospitalizacija u novorođenačkoj dobi smanji za 30%.

Zanimljivo je kako je tek 2014. godine objavljena studija Lavezzia i sur. kojom se postojanje nikotinskih receptora, a time i vezanje nikotina za istoimene receptore na epitelu sluznice bronha, povezuje s nepovoljnim razvojem plućnog tkiva i implicira razloge za perinatalnu smrt novorođenčadi. Studijom je s jedne strane dokazano, kako nikotin nije samo sastojak odgovoran za neuropsihološku reakciju izazivanja ovisnosti, nego zaista izaziva promjene epitela koje se mogu iskazati ne samo tijekom aktivnog, nego i pasivnog pušenja, što je naravno ključno za novorođenče. Naime, na citoplazmatskim membranama bronhalnog epitela ali i u fibroblastima oko kapilara, nalaze se alfa-7 podjedinice nikotinskih receptora kako u majke tako i u fetusa za koje se veže nikotin te izaziva povratnom spregom (eng. „up-regulation“)

hipoplaziju i/ili agenezu moždanih centara odgovornih za razvoj mozga, prijenos serotonina, izostanak razvoja „pre-inspiratornih“ neurona koji su odgovorni za započinjanje pokreta disanja te ritmogenezu. Dakle, zahvaljujući značajnoj korelaciji neuropatoloških rezultata i smanjenja broja alveola uz prekomjernu izražajnost nikotinskih receptora, popraćenu također hipoplazijom pluća fetusa, u okruženju majčinog pušenja tijekom trudnoće novorođenčadi preminule uslijed SIDS/SIUDS-a, Lavezzi AM i sur. zaključuju kako je izlaganje ploda pasivnom pušenju tijekom intra ili ekstrauterinog života, traženo objašnjenje iznenadne smrti novorođenčeta/dojenčeta, a u preživjelih uzrokom respiratornih tegoba.¹⁰⁰ Autori su se koristili metodom mjerenja zrelosti pluća fetusa i neonatusa po Emery i Mithalu¹⁰¹.

6.3. Patohistološka analiza

Makroskopski izgled posteljice nije pokazao razlike između ispitivanih skupina glede uspoređivanih parametara (volumen posteljice, oblik posteljice, dužina pupkovine, insercija pupkovine, poremećaji pupkovine, akutni infarkti, kronični infarkti, te značajke ovoja). Pojedine makroskopske značajke bile su prerijetke da bi se uopće moglo statistički upoređivati kao npr. krvni podljevi. Stiče se dojam kako su se značajke ovoja (glatkoća, zamućenost, zadebljanost, mekonij) pokazali još kao najosjetljiviji pokazatelji moguće intoksikacije s obzirom na graničnu vrijednost statističke značajnosti ($p=0,0582$).

Pretraživanjem literature teško se nalaze usporedive studije s obzirom da većina analizira morfološke promjene posteljica prerano rođenih beba u čijoj pozadini može i ne mora biti izloženost pušenju. Zanimljivo je da je fetalni zastoj rasta praćen promjenama posteljice, prije svega smanjenjem njezine težine¹⁰² i omjera fetalne u odnosu na placentarnu težinu¹⁰³, pa čak i promjenom načina insercije pupkovine, dužinom pupkovine, te prisutnošću čvorova¹⁰⁴, kao i patohistološkim promjenama kao što je kronični vilitis, nakupljanje periviloznog fibrina¹⁰⁵ isl. Niti jedna od prethodno navedenih makroskopskih promjena nije zabilježena u statistički značajnim razlikama između ispitivanih skupina u ovoj studiji, za razliku od patohistoloških koje su bile statistički značajno izražene u posteljicama opterećenim izlaganjem duhanskom dimu. Iz navedenog proizlazi pretpostavka kako razvoj

makroskopskih promjena mora proizlaziti iz značajnog zastoja rasta kako posteljice tako i fetusa, što implicira više involviranih mehanizama, endogenih i egzogenih, koji imaju pozitivnu i negativnu ulogu u izgradnji posteljičnoga tkiva. U skladu s time je studija Vedmedovske i sur. koja je uspoređivala značajke preterminskih i terminskih posteljica, te je zaista utvrdila, zapravo očekivano statistički značajno smanjenje težine posteljica kao i omjera fetoplacentarne težine, dok su histološki parametri poput hematoma, infarkta, zadebljanja trofoblastičke bazalne membrane pokazali statistički značajniju učestalost odnosno zadebljanje upravo u preterminskih posteljica među kojima je čak osam roditelja aktivno pušilo, dok u kontrolnoj skupini niti jedna, pri čemu treba naglasiti kako su skupine bile minimalno statistički relevantne (po 50 ispitanica u ispitivanoj i kontrolnoj skupini). Autorica ističe kako su upravo u preterminskih posteljica izloženih duhanskom dimu značajno učestaliji bili trombi kao i infarkti.¹⁰⁶ Opisane morfološke promjene po mišljenju nekih autora, zbog manjka fetoplacentarnog dotoka kisika i narušavanja integriteta posteljičnog tkiva, mogu biti pozadina za razvoj kronične abrupcije posteljice.¹⁰⁷

Ispitujući posteljice izložene duhanskom dimu, Rocha je utvrdio povećanje gustoće strome, debljine trofoblasta, kao i veličine resice, dok opisuje smanjenje gustoće korionskih resica i korionskih kapilara. Upravo se po pitanju promjene gustoće i promjera korionskih kapilara nailazi na najviše sučeljavanja u novijim istraživanjima koja se bave promjenama morfologije pod utjecajem duhanskog dima ali i sličnih zagađivača okoliša.¹⁰⁸

Na tragu prethodnog istraživanja je analiza mikroskopskih parametara ove studije koja je pokazala statističku značajnost za niz uspoređivanih patohistoloških elemenata odnosno indirektno su otkrivene mikroskopske značajke posteljica svake skupine: uzimajući u obzir dvanaest histoloških elemenata, skupina OP se uspjela razlučiti od posteljica izloženih duhanskom dimu, dok su čak četiri parametra pokazala takav stupanj osjetljivosti koji omogućuje prepoznavanje patohistološkog izgleda posteljice PP u odnosu na sve ostale posteljice izložene duhanskom dimu (skupina AP i KP). Ovakav rezultat bi mogao imati i praktičnu primjenu unatoč činjenici što se pokazalo kako posteljice majki koje puše tijekom cijele trudnoće i posteljice majki koje puše zajedno s partnerima ne pokazuju značajno histološki

različite parametre. Drugim riječima, MIP nije pokazao statistički značajnu razliku usporedbom skupine AP s KP, za razliku od usporedbe OP s PP i PP s AP.

Dakle za razliku od citiranih istraživanja, ova studija ide korak dalje i ukazuje na mogućnost razlikovanja značajki posteljica pojedinih skupina, osobito onih koje nisu izložene duhanskom dimu od onih koje jesu.

Skalarni indeks izražen za svaki mikroskopski elemenat se pokazao kao posebno osjetljiv parametar jer u sebi sadrži kvantitativnu i kvalitativnu procjenu patohistološke promjene posteljičnog tkiva, drugim riječima u sebi objedinjuje difuznost i intenzitet proučavane promjene. Graduiraњem u tri stupnja dobila se blaga, umjerena i naglašena zastupljenost promjene određenog mikroskopskog parametra koja se pokazala dovoljno osjetljivom da može s $p=0,0000$ razlučiti mikroskopske razlike između čak dvanaest patohistoloških elemenata.

Naime, skupina OP pokazala se kao skupina posteljica s pretežitо blago izraženim akutnim infarktima, mikrokalcifikatima, blagim povećanjem gustoće korionskih resica, blagim povećanjem broja, promjera, te zadebljanja bazalne membrane fetalnih kapilara, blagom proliferacijom citotrofoblasta i prisutnosti sincicijskih čvorića, te blagim zadebljanjem uteroplacentarne membrane, dok se kao umjereno izražene promjene javljaju kronični infarkti s umjerenim količinama periviloznog i inviloznog fibrina, te umjerenog fibrozom strome korionskih resica. Dakle, niti jedan patohistološki parametar nije bio u niti jedne ispitanice skupine OP promijenjen na način da bi se mogao okarakterizirati kao naglašena promjena. Posteljicama dominiraju histološke značajke blage ili umjerene izraženosti.

Usporedba OP v PP pokazala je statistički značajnu razliku skalarnih indeksa (SI) u čak dvanaest promatranih patohistoloških parametara.

Skupinu PP karakteriziraju blago izraženi mikrokalcifikati, dok su umjereno izraženi akutni infarkti, prisutnost inviloznog fibrina, zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara, proliferacija citotrofoblasta, sincicijskih čvorića, te ukupno zadebljanje uteroplacentarne membrane. Naglašeno su bili izraženi kronični infarkti, perivilozni fibrin, povećanje gustoće korionskih resica, povećanje broja i promjera fetalnih

kapilara, te fibroza strome resica. Iz prethodnog proizlazi podjednaka zastupljenost umjereno i naglašeno izraženih histoloških promjena kao osnovna prepoznatljiva značajka posteljica pasivno izloženih duhanskom dimu.

Usporedba PP s AP pokazala je statistički značajnu razliku u samo četiri skalarna indeksa (SI): gustoća korionskih resica, zadebljanje bazarne membrane, poliferacija citotrofoblasta, te povećanje površine uteroplacentarne membrane. Na taj način su otkrivena četiri najosjetljivija histološka parametra čija naglašena izraženost uz druge niže navedene značajke, sugerira posteljice skupine AP i/ili KP.

Razlog tome leži u činjenici da skupina AP i KP dijele iste razrede izraženosti promjena za pojedine parametre, iako postotci nisu identični. Drugim riječima u skupinama AP i KP kao blaga promjena javljaju se jedino mikrokalcifikati što je vjerojatno arteficijalan rezultat s obzirom da su svi uzorci posteljice uzimani iz šireg centra posteljice, a ne iz periferije gdje je i broj kroničnih infarkta kao i mikrokalcifikata iskustveno najučestaliji. Stoga je upitna i vjerojatno nerealna vrijednost, mikrokalcifikata kao histološkog parametra. Umjereno izraženi su akutni infarkti, te intervilozni fibrin, dok su svi ostali parametri pokazali naglašenu izražajnost: kronični infarkti, perivilozni fibrin, povećanje gustoće korionskih resica, broja i promjera fetalnih kapilara, te zadebljanje membrane fetalnih kapilara, zatim fibroza strome korionskih resica, proliferacija citotrofoblasta, sincicijskih čvorića, kao i ukupno zadebljanje uteroplacentarne membrane. Drugim riječima, u skupinama AP i KP značajno prevladavaju naglašeno izražene histološke promjene tkiva.

Niti jedan od skalarnih indeksa (SI) pri usporedbi AP s KP nije pokazao statistički značajnu razliku.

Bitno je naglasiti kako se u literaturi ne mogu pronaći usporedivi rezultati, jer se po prvi puta pokušava na temelju patomorfološke (i imunohistokemijske) analize otkriti pripadnost posteljice određenoj skupini koja nije ili jest bila izložena duhanskom dimu, te ako jest – na koji način.

Većina usporedivih studija analizira morfološke promjene posteljica prijevremeno rođenih beba u čijoj pozadini može i ne mora biti izloženost pušenju. Zanimljivo je da

je fetalni zastoj rasta praćen promjenama posteljice, prije svega smanjenjem njezine težine¹⁰² i omjera fetalne u odnosu na placentarnu težinu¹⁰³, pa čak i promjenom načina insercije pupkovine, dužinom pupkovine, te prisutnošću čvorova¹⁰⁴, kao i patohistološkim promjenama kao što je kronični vilitis, nakupljanje periviloznog fibrina¹⁰⁵ isl. Niti jedna od prethodno navedenih makroskopskih promjena nije zabilježena u statistički značajnim razlikama između ispitivanih skupina u ovoj studiji, za razliku od patohistoloških koje su bile statistički značajno izražene u posteljicama opterećenim izlaganjem duhanskom dimu. Iz navedenog proizlazi premisa kako za makroskopske promjene posteljica mora zaista postojati značajni zastoj rasta kako posteljice (pa onda i fetusa), što ukazuje na više uključenih endogenih i egzogenih mehanizama koji imaju pozitivnu i negativnu ulogu u izgradnji posteljičnoga tkiva. U skladu s time je studija Vedmedovske i sur. koja je uspoređivala značajke preterminskih i terminskih posteljica, te je zaista utvrdila, zapravo očekivanu statistički značajno smanjenje težine posteljica kao i omjera fetoplacentarne težine, dok su histološki parametri poput hematoma, infarkta, zadebljanja trofoblastičke bazalne membrane pokazali statistički značajniju učestalost upravo u preterminskih posteljica među kojima je čak osam roditelja aktivno pušilo, dok u kontrolnoj skupini niti jedna. Treba naglasiti kako su skupine bile minimalno statistički relevantne (po 50 ispitanica u ispitivanoj i kontrolnoj skupini). Autorica ističe kako su upravo u preterminskih posteljica izloženih duhanskom dimu značajno učestaliji bili trombi kao i infarkti.¹⁰⁶ Park i sur. također rade studiju na preterminskim posteljicama, te utvrđuju značajno veći udio infarkta nego u kontrolnoj skupini terminskih posteljica.¹⁰⁷ Ispitujući posteljice izložene duhanskom dimu, Rocha JES je utvrdio povećanje gustoće strome odnosno pojačanu fibrozu, debljine trofoblata, i veličine resice što je u skladu s ovom studijom dok opisuje smanjenje gustoće korionskih resica i korionskih kapilara što se razlikuje od prezentiranih rezultata u ovoj studiji.¹⁰⁵

Upravo se po pitanju promjene gustoće i promjera korionskih kapilara nailazi na najviše sučeljavanja u recentnim istraživanjima vezanim uz promjenu morfologije pod utjecajem duhanskog dima ali i sličnih zagađivača okoliša.

Naime, izloženost policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAH, eng.) smatra se jednim od najvažnijih kancerogenih elemenata duhanskog dima. Rennie je svojim radom na mišjim posteljicama izložila kako izlaganje aromatskim ugljikovodicima

dovodi do poremećaja fetoplacentarnog vaskularnog razvoja na način da je vaskularno stablo posteljice pokazalo povećanje krivudavosti/zakrivljenosti krvnih žila i značajno povećalo „tortuosity ratio of the tree“, redukciju intraplacentarnih arterija za 17 % prije svega zbog smanjenja broja arteriola za 27%, no nije bilo promjene broja korionskih žila, dubine ili razgratosti stabla, kao niti promjene promjera istih. Dakle, vaskularno placentarno stablo po izlaganju PAH po svemu je nalikovalo kontrolnoj skupini, osim što je bilo oskudnije ili slikovito kazano razrijeđenije „krošnje“ što je imalo za posljedicu porast arterijskog vaskularnog otpora za 30 % koji za sobom povlači 19% manji protok krvi, a što je dovoljno za doprinos padu do 23% fetalne težine u odnosu na kontrolnu skupinu. Drugim riječima vaskularno stablo PAH-posteljica nije bilo manje, već rijeđe, što po mišljenju autorice objašnjava zašto nije bilo razlike u težini kontrolnih posteljica i posteljica izloženih duhanskom dimu.¹⁰⁸

Međutim, suradni tim iste autorice je u svom prethodnom istraživanju, također na mišjim posteljicama, dobio potpuno suprotne rezultate, odnosno doveo do zaključka kako izlaganje aromatskim ugljikovodicima izaziva povećanje broja kapilara.¹⁰⁹ Rennie i sur. su to objasnili kompenzatornim rastom kapilara koja se događa, kako autori kažu, u miševa, ali ne i u humanih placenti, što je „zanimljiv“ zaključak autora, tim više jer su sva istraživanja bila provedena na mišjim posteljicama, a sličnih na humanima nema. Upravo suprotno bi govorili rezultati dobiveni u ovoj studiji, jer unatoč teškoj izloženosti posteljice duhanskom dimu tijekom svih 40 tjedana trudnoće, do značajnog pada težine i volumena posteljice nije došlo, dok s druge strane postoji značajno povećanje broja i veličine korionskih kapilara, što zaista jest „kompenzatorni rast“ izazvan očito egzogenim uzročnikom, koji je maseno i voluminozno, dakle u svoj ukupnosti, nadomjestio mogući pad arteriola u određenoj fazi fetalnog razvoja.¹⁰⁹

Zanimljiva je i s prethodnim u vezi pretpostavka istraživačkog tima Rizzo i sur. koji su ispitujući posteljice majki koje puše više od 10 cigareta dnevno s Doppler – UZV utvrdili kako u gestacijskoj dobi od 11+3 do 13+6 tjedana dolazi do značajne redukcije placentarne vaskularizacije za razliku od majki nepušačica i majki koje su pušile manje od 10 cigareta dnevno, a čije posteljice nisu pokazale promjene. Opisani nalazi su bili u korelaciji s novorođenačkom tjelesnom težinom odnosno njezinim smanjenjem u majki koje su pušile tijekom trudnoće.¹¹⁰

Međutim, Akbulut i sur. razmišljaju kako je korangioza ili vaskularna hiperplazija terminalnih korionskih resica, koja se definira kao pojava 10 ili više resica s 10 ili više kapilara u 10 ili više malih vidnih polja (LPW, eng.) u neinfarciranom dijelu posteljičnog tkiva, koju su istraživali na 92 posteljice izložene duhanskom dimu ili okolišnom zagađenju zraka, događa obično nakon 20 tjedna gestacije, a po većini autora u oko 5-6% posteljica.^{111,112} Akbulut i sur. utvrdili su korangiozu u 14% pregledanih posteljica, i to većinom terminskih posteljica.¹¹¹ Za razliku od hiperplastične vaskularizacije, normalna korionska resica sadrži do pet kapilarica. Po mišljenju mnogih autora, vaskularna hiperplazija se redovito događa u posteljica koje rastu u uvjetima kronične hipoksije, a pušenje je samo jedan od mogućih čimbenika koji ju potiču.¹¹³

Zdravković i sur. su mišljenja kako cigaretni dim i nikotin, osobito ako majke puše više od 20 cigareta dnevno, dovode do dramatične izražajnosti vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) u svim stanicama trofoblasta kao i u stromi korionskih resica s posljedičnim povećanjem malih vaskularnih prostora. Naime, kao odgovor na ekspoziciju duhanskom dimu koji dovodi do hipoksije posteljice, smanjuje se proliferacija citotrofoblasta, ali je pojačana produkcija angiogenih čimbenika (HIF, VEGF) s posljedičnim zastojem rasta fetusa uz istovremeno paradoksnu smanjenje rizika od preeklampsije.¹¹⁴

6.4. Morfološki indeks posteljice (MIP)

Kako je morfološki indeks posteljice (MIP) odraz zbroja skalarnih indeksa za svaki patohistološki parametar prethodno izražen kao zbir kvantitativnog i kvalitativnog indeksa, u potpunosti slijedi razrede izraženosti skalarnih indeksa (blago, umjereno, naglašeno), ali pojednostavljeno, u obliku jedinstvenog indeksa za svaku skupinu. Iz prethodnog slijedi logično stupnjevanje MIP na niski, srednji, te visoki. Na taj način razlučivost skupina postaje još jasnijima.

Naime, skupine OP i PP karakterizira srednji MIP, s napomenom kako je MIP skupine OP na samoj donjoj granici srednjeg razreda intoksikacije posteljice, dok MIP skupine PP se nalazi na gornjoj granici istoga razreda. Stoga iako nominalno

pripadaju istom razredu, zapravo se bitno razlikuju u intenzitetu morfoloških promjena što se najbolje predočilo prikazom medijana i raspona MIP za sve skupine, pa tako i skupine OP i PP. S druge strane, skupine AP i KP su obilježene visokim razredom intoksikacije s minimalnom razlikom u zastupljenosti, pa možemo reći da pokazuju morfološke promjene čiji intenzitet različitosti morfoloških promjena ne dopušta razlučivanje pripadnosti posteljica tim skupinama na temelju samo morfoloških mikroskopskih promjena.

Opisane morfološke različitosti, koje sugeriraju već pri mikroskopskom pregledu mogućnost razlučivanja posteljice nepušača od posteljice pušača, pa onda i ovisno o intenzitetu promjena, izdvajanje posteljica u kojima majka aktivno puši, potvrđuju statističke značajnosti razlike što daje za pravo razmišljati kako MIP može poslužiti kao pokazatelj intoksikacije posteljice duhanskim dimom.

6.5. Imunohistokemijska analiza

Statistička analiza pokazala je značajne rezultate međusobnom usporedbom skupina s obzirom na analizu HSP 70 i metalotionein, ali ne i s obzirom na Bcl-2, dok je rasap za p53, iako značajno različit s obzirom na skupine, bio grupiran samo u najviše razrede skalarnog indeksa što nam sugerira manjak osjetljivosti zbog čega je ipak isključen iz izračuna Imunohistokemijskog indeksa posteljice (IHIP).

Rezultati za p53 grupirani su u svega tri najviša razreda skalarnih indeksa, ona s vrijednosti od 4 do 6 ($p=0,0000$). Maksimalni SI pokazuje od 0,0% u skupini AP preko 9,7% u skupini PP do 10,1% u skupini KP, za razliku od skupine OP gdje čak 35,8% posteljica pokazuje maksimalni skalarni indeks.

Dakle značajno različit udio nepromijenjenog divljeg tipa p53 bio je maksimalno izražen upravo u posteljicama neizloženim duhanskim dimu tijekom trudnoće.

Drugim riječima, iako nakon prikazanog rasapa neuporabiv za izradu IHIP, p53 izvrsno odražava očuvanost nemutiranog p53 po skupinama. Naime, u niti jednoj skupini ne nalazi se slaba izraženost divljeg tipa p53 (skalarni indeks 1-2). Iz toga proizlazi kako je pokretanje apoptoze kao programirane stanične smrti minimalno

izraženo u svim posteljicama čemu također u prilog govori visoka ekspresivnost bcl-2 u svim skupinama. Tako se maksimalna izražajnost bcl-2 u obliku skalarnog indeksa vrijednosti 6 pokazala u 45,4% posteljica skupine KP, u 44,3% posteljica skupine AP, u 50,8% posteljica skupine PP i čak 60,8% posteljica skupine OP. Iako je prisutan uzlazan rast ekspresivnosti markera od skupine posteljica najizloženijih duhanskom dimu prema najmanje izloženima, ipak to nije bilo dovoljno sa potvrdu statistički značajne razlike ($p=0,2343$)

Iz prethodno navedenog nameće se pitanje, može li apoptoza biti pokretač prijevremenog poroda ili je ona samo refleksija intoksikacije posteljice izražene kroz mutacije p53 i Bcl-2?

Hipotetski govoreći, posteljica visoke intoksikacije, sa znatno narušenom genetskom održivošću pokreće intracelularni mehanizam kojem se zbog prijetnje „uništenja“ posteljice opiru anti-apoptotski mehanizmi. Ukoliko su nadvladani, pokreće se molekularnim signalnim putevima preuranjeni porođaj, kao što je opisano u trudnica izloženih djelovanju duhanskog dima. Gledano iz druge perspektive, znači li to zapravo da rodilje koje unatoč visokoj izloženosti posteljice duhanskom dimu očuvaju terminsku trudnoću, imaju izvrsne mehanizme popravka DNA i/ili neke druge kolateralne molekularne mehanizme zahvaljujući kojima oksidativni stres i/ili mutacije genoma budu održivi tijekom 40 gestacije pa ne dolazi do prijevremenog porođaja ili pobačaja, za razliku od rodilja koje takove mehanizme nemaju ili su nadjačani toksičnim agensima, što onda dovodi do prijevremenog poroda?

Upravo u prilog ovakovom razmišljanju govore nedavni rezultati znanstvenih istraživanja. Naime, sve se više studija bavi oksidativnim stresom kao okidačem apoptotskih zbivanja tijekom intrauterinog života, osobito onog pod utjecajem okolišnog zagađenja u obliku duhanskog dima. Gubitak ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidansa koji neumitno dovodi do oksidativnog stresa, koji će uz nadzor p53 započeti kaskadom kaspaza programiranu staničnu smrt, dio je fiziologije pucanja ovoja po mišljenju Menon i sur.¹¹⁵ koji se u slučaju ekstremnih uvjeta intoksikacije duhanskim dimom mogu dogoditi i prijevremeno. Autori su mišljenja kako cigaretni dim i potencijalno drugi zagađivači okoliša induciraju oksidativni stres i endogenu produkciju autotoksičnih lipida ubrzavajući tako apoptozu fetalnih ovoja

imajući za posljedicu prijevremeno pucanje ovoja. Fortunato¹¹⁶ je mišljenja kako se u cijeli proces pucanja ovoja uključuje i pojačana ekspresija gena za matriks metaloproteinazu 2 pri čemu ključnu ulogu ima p53. Međutim, novija literatura osobito skreće pozornost na epigenetske promjene, pa tako Sbrana i sur. ističu kako nedostatak antioksidansa zbog funkcionalne delecije prisutne u više od 20% populacije zbog čega nema stvaranja glutathion S-transferaze, antioksidansa koji sudjeluje u II. fazi razgradnje metabolita nikotina, dovodi do nakupljanja istih u posteljici odnosno dolazi do aberantnog metabolizma nikotina što se manifestira oksidativnim stresom s pratećim oksidativnim oštećenjem tkiva koji u konačnici dovodi do smanjenja porođajne težine djeteta, dok se na histološkoj razini opaža proliferacija sincicijskih čvorića.¹¹⁷ Prema tome osjetljivost na izlaganje duhanskom dimu vjerojatno uključuje niz čimbenika, koji uz prethodno navedene epidemiološke, socioekonomske, imaju genetsku i epigenetsku pozadinu. U komentaru za British Journal of Pharmacology Lim R i sur. idu čak korak dalje navodeći kako nikotin može biti krucijalni sastojak cigaretnog dima koji je odgovoran za dugoročne efekte maternalnog pušenja po potomstvo imajući u vidu rad Bruin i sur. koji navodi veću učestalost oštećene fertilitnosti, tip II dijabetesa, patološke debljine, hipertenzije, neurobihevioralnih oštećenja, te disfunkciju respiratornog sustava.^{118,119} Posebno se ističe studija Xiao i sur. koji izvještavaju o prvom dokazu utjecaja izlaganja fetusa nikotinu tijekom intrauterinog razvoja na fetalno programiranje oksidativnog stresa u odraslom potomstvu. Drugim riječima epigenetske promjene nastale tijekom antenatalne ekspozicije nikotinu dovode do razvoja vaskularnog oksidativnog stresa te posljedično tome do razvoja hipertenzije i drugih vaskularnih bolesti u odrasloj dobi. Autori zaključuju kako se zapravo radi o remodeliranju kromatina za početak metaboličkih promjena u odrasloj dobi.¹²⁰ Buduće epigenetske studije su potrebne kako bi povećale razumijevanje bioloških procesa fetalnog programiranja koji je pod utjecajem prenatalne i perinatalne ekspozicije nikotinu.¹¹⁹

6.6. Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP)

Statistički značajno različita izražajnost HSP-70 i metalotioneina između ispitivanih skupina također je zanimljiva što se osobito pokazalo pri izračunu skalarnih indeksa. Tako je skupina OP karakterizirana umjerenom izražajnošću HSP-70 i metalotioneina,

dok su skupine PP, AP i KP obilježene naglašenom izražajnošću HSP-70 i metalotioneina.

Posljedica toga je i očito razdvajanje imunohistokemijskog indeksa (IHIP) na srednji IHIP za skupinu OP i visoki IHIP za sve ostale skupine koje međusobno ne pokazuju statistički značajnu razliku izražajnosti indeksa. Korelacija je definitivno pokazala povezanost pušenja i IHIP, odnosno potvrđeno je kako pušenje povećava intoksikaciju posteljice kroz povećanje IHIP.

Slijedom navedenog možemo zaključiti kako imunohistokemijskoj reakciji u skupinama PP, AP i KP prethode zbivanja koja ne ovise o načinu izlaganja posteljica duhanskom dimu, već o količini patološkog egzogenog agensa kojemu su one izložene.

Upravo to svojstvo iznimne osjetljivosti HSP-70 i metalotioneina omogućuje razlikovanje posteljica koje u niti kojem obliku nisu bile tijekom majčine trudnoće izložene duhanskom dimu. Dakle srednji IHIP kakav krasi skupinu OP, uzrokovan je nekim drugim oblicima egzogenog (ali i endogenog) djelovanja na posteljicu (npr. industrijski zagađivači isl.), dok je visoki IHIP koji se temelji na visokoj izražajnosti markera u prosječno 70 posto ispitanica skupina PP, AP i KP, znak je prije svega intoksikacije izazvane duhanskim dimom.

Također treba imati u vidu kako je jedini kriterij za uvrštenje roditelja u skupinu OP bilo njezino negiranje izloženosti duhanskom dimu; odnosno skupinu OP sačinjavale su trudnice koje nisu nikada pušile, niti su tijekom trudnoće bile izlagane pasivnom pušenju. Iako je anketni upitnik pokušao precizirati da nepušenje u trudnoći znači nepušenje tijekom svih 40 tjedana trudnoće, a ne prestanak pušenja nakon spoznaje o trudnoći, treba biti realan i prihvatiti izglednu mogućnost da je izvjestan broj roditelja zatajio svoj pušački status dajući lažno negativan odgovor, ili zbog nerazumijevanja anketnog upitnika ili zbog neugode izazvane iznošenjem svog statusa unatoč činjenici da je maksimalna diskrecija bila zagwarantirana kako pri ispunjavanju upitnika, tako i pri unosu podataka (podatci su unošeni pod kodiranim brojem u bazu podataka). Posljedično tome, čak i manji broj lažno negativnih anketa zbog osjetljivosti imunohistokemijske analize može mijenjati težište skupine OP prema

srednjem umjesto prema niskom IHIP. Jedini način prevencije lažno negativnih podataka u budućim istraživanjima jesu preventivne pretrage krvi i/ili urina na metabolit nikotina kotinin.

Pretpostavku kako su upravo HSP-70 i metalotionein idealni kandidati za pokazatelje intoksikacije posteljica duhanskim dimom potvrđuje najnovija literatura.

Spriječavanje transporta teških metala iz majčine krvi u fetus, kao što je već prethodno spomenuto, odvija se upravo na razini posteljice vezanjem primjerice kadmija kao najeksponiranijeg i najzastupljenijeg u cigaretnom dimu, za metalotionein, čime posteljica dobiva ulogu zaštitne barijere, ali i mogućeg indikatora sresa i intoksikacije. Iz toga razloga je prepoznavanje metalotioneina kao potencijalnog pokazatelja intoksikacije duhanskim dimom tek logičan slijed razmišljanja. Naime, Sorkan HC i sur. su imunohistokemijskim bojenjem posteljičnoga tkiva otkrili žarišta guste ekspresije metalotioneina u stanicama sinciotrofoblasta i intersticijskih stanica korionskih resica koja su interpretirali kao pozitivno (+) ili negativno (-) bojenje bez pokušaja detaljnije kvantifikacije ili kvalifikacije. Time su pokazali kako se kadmij nakuplja u placenti izloženih duhanskom dimu pri čemu je najveća akumulacija bila upravo u skupini ispitanica koje puše. Međutim, pojačana sinteza metalotioneina koji s kadmijem stvara kompleks, interferira s prijenosom mikronutrijenata poput cinka (Zn), magnezija (Mg), mangana (Mn), bakra (Cu), selena (Se) i kalcija (Ca) nužnih za pravilan neurosomatski razvoj fetusa.¹²¹ Studija Kippler i sur. po prvi puta je dokazala kako nakupljanje kadmija u posteljici prati niska razina cinka u krvi pupkovine. Drugim riječima multiplom linearnom regresijskom analizom pokazano je kako niska porođajna težina i opseg prsnoga koša manji od prosjeka za gestacijsku dob izravno ovise o visokoj razini kadmija u posteljici odnosno niskoj razini cinka u krvi pupkovine.¹²² Zanimljivo je da se kadmij s većom efikasnošću apsorbira prilikom inhalacije, nego ingestijom, stoga je duhanski dim kao i industrijski zagađivači, od osobitog interesa za velik broj istraživača koji su slijedom pokazali kako kadmij negativno utječe na migraciju humanih stanica trofoblasta.¹²³ Zhang Q i sur. pokazali su kako inhaliranje kadmija također utječe na homeostazu kalcija u organizmu odnosno na način da smanjuje ekspresiju S100P proteina.¹²⁴ Naime, S100P proteini su jedna od tri najveće S100 skupine transportnih bjelancevina na

koje se veže kalcij (Ca^{2+} - binding protein), a čija uloga je regulacija intrastaničnih procesa, uključujući održavanje homeostaze kalcija te zaštita od oksidativnog stresa.¹²⁵ Pokazalo se kako su ispitanice iz grada Guiyu zagađenog teškim metalima zbog prerade elektroničkog otpada, u citoplazmi imale niže razine S100P bjelančevina nego kontrolna skupina odnosno pokazala se negativna korelacija između koncentracija placentarnog kadmija i placentarnog S100P proteina.¹²⁶ Da bi se značenje kadmija u metabolizmu posteljice i fetusa u potpunosti rasvijetlilo, potrebno je dodati kako se teratogeno i embriotoksično djelovanje kadmija pokazuje u ranoj trudnoći, dok toksični utjecaj na posteljicu značajka uznapredovale trudnoće. Ovaj specifični utjecaj proizlazi iz njegovog vezanja za metalotionein, pri čemu pokazuje kompetitivnu ulogu u odnosu na cink. Naime, metalotionein se veže s kadmijem većim afinitetom nego s cinkom, iz čega proizlazi da se cink lako otpušta, dok kadmij ostaje čvrsto vezan uz metalotionein.¹²⁷ Nameće se misao kako upravo nakon zasićenja bazičnih razina metalotioneina u placenti kadmijem, kod produljenja ili recidivirajuće ekspozicije kakva se događa kod maternalnog pasivnog i/ili aktivnog pušenja, izaziva pojačanu sintezu metalotioneina vjerojatno kroz ekspresiju MT gena.¹²¹ Garcia-Esquinas i sur. utvrdili su kako novorođenčad majki koje su pušile tijekom trudnoće imaju 15% veću koncentraciju olova i 22% veću koncentraciju kadmija u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu.¹²⁷ Međutim, precizna uloga metalotioneina u prijenosu kadmija od majke na fetus nije još uvijek jasna, iako je najnoviji uradak Nakamure i sur. značajno rasvijetlio i taj transfer. Izlaganjem skotnih ženki štakora različito visokim dozama kadmija, te potom mjerenjem koncentracije kadmija, autor je došao do slijedećih zaključaka: 1) koncentracija kadmija u uterusu i posteljici značajno je porasla u ovisnosti o dozi ekspozicije a što je smatraju autori izravna posljedica o dozi ovisnom porastu kadmija u krvi majke, 2) kadmij se prenosi fetusu također na način ovisan o dozi ekspozicije čemu u prilog govori činjenica da su novorođeni štakori prvi dan po okotu imali značajno veću koncentraciju kadmija u jetri nego u bubrezima, dok je krajem četvrtog tjedna koncentracija kadmija u bubrezima bila značajno veća nego u jetri. Autori zaključuju kako metalotionein ne može funkcionirati kao apsolutna barijera prijenosu kadmija u fetus, da je taj prijenos ovisan o dozi ekspozicije, te da će se dogoditi zapravo u značajnoj mjeri jedino kod kroničnih i teških ekspozicija kadmiju, kada unatoč pojačanoj ekspresiji MT-gena i proizvodnji metalotioneina čak i tako povećani novostvoreni kapacitet hvatanja teških metala bude nadmašen novim ekspozicijama,

pa kadmij „curi“ kroz placentu kao rezultat morfološkog oštećenja tkiva posteljice, zbog čega se onda akumulira u tkivu jetre prije svega.¹²⁸

Humani genom enkodira 13 članova HSP-70 obitelji (HSPA), među kojima je najpoznatiji oblik inducibilan stresom HSP-70/HSP-72 (HSPA1A). Citosolni inducibilni HSP-70 regulira citoprotektivne, antiapoptotičke, imunološke efekte. Pojačana ekspresija se u eksperimentalnim modelima javlja uslijed moždanog udara, sepse, akutnog respiratornog distres sindroma, zatajenja bubrega, ishemije miokarda.¹²⁹ Embrionalni HSP-70 igra ulogu u normalnom razvoju embrija, u procesima poput apoptoze, regulacije staničnog ciklusa, te štiti od stresora tijekom osjetljivih faza embriogeneze.¹³⁰ Molvarec i sur. dodaju kako se HSP-70 nalazi u perifernoj cirkulaciji zdrave trudnice. Zanimljivo je da je koncentracija HSP-70 u trudnice manja nego u žene koja nije trudna, te da pokazuje pozitivnu korelaciju s gestacijskom dobi, a negativnu s dobi trudnice. Kako je fetus zapravo polu-alograft, autori smatraju kako upravo HSP-70 podržava očuvanje imunološke tolerancije prema fetusu, dok povišene koncentracije (koje su zapravo najviše u terminu) utječu na početak poroda.¹³¹ Promatran u kontekstu izlaganja duhanskom dimu, treba reći kako je porast HSP-70 opažen u različitim vrstama stresa, kao što je vrućina, ishemija, oksidativni stres, teški metali, zračenje, kao i ekspozicija upalnim citokinima.¹³² Naime, HSP-70 je visoko konzervirani protein tijekom cijele evolucije čija protektivna uloga održava strukturnu stabilnost bjelančevina. Naime duhanski dim sadrži 10^{14} - 10^{16} slobodnih radikala po ispuhu (po „dimu“) koji remeti ravnotežu između antioksidansa i slobodnih radikala te dovodi do oksidativnog stresa i iniciranja apoptotskih mehanizama kako u epitelu dišnih puteva majke, tako i u posteljici.¹³³ No zbog antiapoptotičke uloge HSP obitelji, prije svega inhibiranjem kaskade kaspaza (npr. HSP-70 inhibira kaspazu 3 i 9), programirana stanična smrt se odgađa ili u potpunosti zaustavlja.¹³⁴ Ovakova stanja stoga pojačavaju ekspresiju HSP-70, što se pokazalo i u ovom istraživanju, gdje je najizraženija imunohistokemijska reakcija bila upravo u trudnica najviše opterećenih izlaganjem duhanskom dimu. U prilog prethodnom također govori studija Bachelet i sur. koji izvješćuju kako koncentracija više od 10 μ M kadmija u duhanskom dimu je bila dovoljna da inducira prekomjernu izražajnost HSP-70 i razvije u punoj mjeri protektivnu ulogu koja omogućuje stanicama oporavak i preživljavanje nakon stresnog događaja kao što je oksidativna ozljeda. No ekstremno velike doze (veće od navedene) izazivaju pad GSH/ATP i

staničnu smrt. Autori zaključuju kako prethodno navedeno sugerira da je upravo HSP-70 najosjetljiviji indeks za intoksikaciju kadmijem odnosno duhanskim dimom, a što je u potpunosti u skladu s rezultatima ove studije.¹³⁵ Zanimljivi su rezultati istraživanja Abdulsid i sur. koji je pokazao kako HSP-70 najveću ekspresiju pokazuje u središnjem dijelu pupkovine odnosno u radijusu od oko 2 do 4 cm oko insercije pupkovine.¹³⁶ Treba dodati kako su i uzorci posteljice za svrhe ovog istraživanja uzimani upravo iz područja šireg centra posteljice, pri čemu se najčešćom pokazala paracentralna insercija pupkovine. Vayssier i sur. su mišljenja kako HSP-70 ne sudjeluje u kancerogenom učinku duhanskog dima, već da stanice izložene duhanskom dimu slijede prividno kontradiktorni utjecaj HSP-70 na apoptozu na način da se privid pojačanog apoptotskog učinka ostvaruje spriječavanjem nekroze i preusmjeravanjem u apoptozu.¹³⁷ Prekomjerna izražajnost HSP-70 bi trebala osigurati porast otpornosti na toksičan učinak duhanskog dima ali samo dok postoje ATP zalihe (prisjetimo se da je apoptoza programirana stanična smrt za čije odvijanje je potrebna energija, za razliku od nekroze koja se odvija bez energetske zaliha), te će ukoliko postoje, stanica biti preusmjerena u apoptozu.¹³⁸ Drugim riječima apoptoza zadržava ukupni integritet posteljice, a posljedično tome bitno se ne mijenjaju dosegnuta masa i volumen, jer po definiciji odluku o apoptozi donosi svaka stanica za sebe. Propadanje takve oštećene odnosno intoksicirane stanice kroz nekrozu značilo bi istovremeno propast veće mase tkiva i izazivanje upalne reakcije koja bi imala dalekosežne nepovoljne posljedice za trudnoću, fetus i posteljicu.

Ekambaram P. smatra HSP središnjim koordinatorom staničnih zbivanja u odlučivanju sudbine stanice.¹³⁸ Funkcija HSP-70 naglašava antiapoptotsku ulogu, koja može biti posljedica njihove nadzorne sposobnosti, već i alternativnog puta inhibiranjem Bax aktivacije i stoga otpuštanjem proapoptotičkih čimbenika kao što je citkrom c iz mitohondrija. Dakle, HSP se upleće odnosno kontrolira odluku o smrti stanice, međutim kad je „odluka donesena“ (vjerojatno preko čuvara genoma, p53), ne miješa se u staničnu smrt.¹³⁹

6.6.Intoksikacijski indeks posteljice (IIP)

Zbroj morfološkog (MIP) i imunohistokemijskog indeksa (IHIP) sačinjava Intoksikacijski indeks posteljice (IIP). IIP-medijan skupine OP i PP pokazuje srednji, dok IIP-medijan skupina AP i KP visoki indeks intoksikacije.

Međutim, dok je medijan skupine OP bliži donjoj granici, medijan skupine PP je na samoj gornjoj granici srednjeg razreda. Ovakav raspored medijana odraz je specifičnog odnosa niskog, srednjeg i visokog razreda intoksikacije unutar skupina: najveći postotak posteljica skupine OP (67,8%) umjerenog je stupnja intoksikacije, dok je u skupini PP jednaki postotak posteljica koje pokazuju umjereni i visoki stupanj intoksikacije ili 49,2%; u skupinama AP i KP najveći udio posteljica pokazuje visoki stupanj intoksikacije ili 75,7% odnosno 77,6%. Zanimljivo je kako se u skupini PP niski stupanj intoksikacije pokazuje u svega 1,5% posteljica, dok niski stupanj ne pokazuje niti jedna posteljica skupina AP i PP.

Drugim riječima analiza je pokazala statistički značajnu razliku u razini intoksikacije između:

1. posteljica koje nisu bile izložene duhanskom dimu u odnosu na posteljice koje su bile izložene neovisno o načinu izlaganja;
2. posteljica koje su bile pasivno izložene duhanskom dimu u odnosu na aktivno ili kombinirano izložene posteljice.

Sažimajući morfološke i imunohistokemijske promjene, IIP postaje osjetljiv indikator intoksikacije posteljice uslijed izlaganja duhanskom dimu, čija najveća vrijednost leži u detektiranju intoksiciranih posteljica, te na taj način IIP omogućuje identifikaciju „loših“ posteljica kao podlogu za otkrivanje novorođenčadi i djece u kojih postoji mogućnost razvoja nepovoljnih zdravstvenih čimbenika.

6.7.Značenje pokazatelja intoksikacije duhanskim dimom

S obzirom na opažanje kako u skupini OP indeksi MIP, IHIP i IIP pokazuju srednju razinu intoksikacije posteljice, dok je u skupinama KP i AP vidljiv visoki MIP, IHIP te IIP koji sugeriraju visoku razinu intoksiciranosti posteljica, Spearmanovom Rang korelacijom dodatno je potvrđena pozitivna korelacija između MIP i IHIP, te pozitivna korelacija između svih indeksa i izloženosti posteljica duhanskom dimu s visokim koeficijentom korelacije (R) i visokim stupnjem statističke značajnosti. Na rezultate nije utjecala niti činjenica kako su u skupini PP MIP i IIP srednjeg, a IHIP visokog stupnja intoksikacije.

Naime, MIP i IIP u skupini PP jest srednjeg razreda, ali kao što je već prethodno spomenuto, na gornjoj granici srednjeg razreda. Ipak, treba istaknuti kako upravo ta razlika čini i razliku više u osjetljivosti uvedenih indeksa u korist IHIP koji se pokazao kao osjetljiviji indikator izlaganja posteljica duhanskom dimu u odnosu na MIP i IIP, što je i logično s obzirom da reflektira promjene na molekularnoj razini u obliku izražajnosti HSP-70 i metalotioneina. Upravo visoka osjetljivost metalotioneina te osobito HSP-70 na toksična zbivanja u posteljici, omogućila je otkrivanje skupine PP također kao visoko rizične skupine, što samo potvrđuje literaturne navode o utjecaju pasivnog pušenja na posteljično tkivo.

Novorođenački pokazatelji nisu pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina, pa se nije mogla napraviti korelacija s MIP, IHIP i IIP odnosno potvrditi uzročno-posljedična veza utjecaja duhanskog dima na novorođenačke pokazatelje. Objašnjenje sugerira sama činjenica da se istraživanje radilo na terminskim posteljicama tj. posteljicama trudnica koje su uspjele iznijeti punu trudnoću pa utvrđene razlike između novorođenčadi različitih skupina ipak nisu bile statistički značajne. Upravo ta činjenica ponovno ukazuje na ključnu ulogu posteljice u postizanju optimalnih novorođenačkih pokazatelja do kraja gestacijske dobi.

Stoga je tim važniji uspjeh studije u otkrivanju histoloških i imunohistokemijskih pokazatelja sa svrhom prepoznavanja posteljica koje su tijekom trudnoće bile izlagane štetnom utjecaju duhanskog dima. Upravo zahvaljujući rezultatima

imunohistokemijske analize, uključene u IHIP i IIP, može se u konačnici govoriti o HSP-70 i metalotioneinu kao o relevantnim imunohistokemijskim pokazateljima intoksikacije posteljice duhanskim dimom, što je osobito važno zbog jednostavnosti primjene istih u praksi.

Prethodno navedeno u ovoj studiji navodi na zaključak kako MIP, IHIP i IIP mogu poslužiti u detektiranju posteljica koje su pretrpjele promjene uslijed toksičnog učinka duhanskog dima, iako novorođenački pokazatelji ne ukazuju na odstupanje, odnosno istraživanje je potvrdilo HSP-70 i metalotionein kao važne imunohistokemijske pokazatelje intoksikacije posteljice.

Utvrđivanje pokazatelja intoksikacije omogućuje identificiranje ne samo posteljica nego i novorođenčadi koja su tijekom intrauterinog razdoblja bila izložena duhanskom dimu, a koja bi u suprotnom ostala neotkrivena. S obzirom na štetne učinke duhanskog dima na fetus, premda novorođenački pokazatelji ne govore tome u prilog, radi se o rizičnoj novorođenčadi koja stoga zahtijeva pojačani nadzor i skrb sve do odrasle dobi.

7. ZAKLJUČCI

1. Na temelju ispitivanih neonatoloških parametara i na temelju makroskopskog pregleda posteljice nije bilo moguće razlikovati novorođenčad koja je bila izložena duhanskom dimu tijekom intrauterinog razdoblja od novorođenčadi koja nije bila izložena.
2. Morfološki indeks posteljice (MIP) kroz analizu dvanaest histoloških elemenata posteljice omogućio je razlikovanje posteljica koje nisu bile izložene duhanskom dimu tijekom intrauterinog razdoblja od posteljica koje jesu bile izložene, te statistički značajno razlikuje posteljice koje su bile izložene pasivnom pušenju od posteljica koje su bile izložene aktivnom pušenju, dok ne razlikuje posteljice koje su bile izložene aktivnom pušenju od posteljica koje su bile izložene kombiniranim oblicima pušenja.
3. Imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP) kroz analizu dva imunohistokemijska markera (metaloionein i HSP-70) omogućio je razlikovanje posteljica koje nisu bile izložene duhanskom dimu tijekom intrauterinog razdoblja od posteljica koje jesu, ali ne i razlikovanje načina izloženosti duhanskom dimu pri čemu se HSP-70 pokazao osjetljivijim parametrom od metalotionina.
4. Intoksikacijski indeks posteljice (IIP) kao zbroj MIP i IHIP omogućio je razlikovanje posteljica koje nisu bile izložene duhanskom dimu tijekom intrauterinog razdoblja od posteljica koje jesu, te statistički značajno razlikuje posteljice koje su bile izložene pasivnom pušenju od posteljica koje su bile izložene aktivnom pušenju, dok ne razlikuje posteljice koje su bile izložene aktivnom od posteljica koje su bile izložene kombiniranim oblicima pušenja.
5. MIP, IHIP i IIP mogu poslužiti kao pokazatelji intoksikacije posteljice duhanskim dimom s obzirom da pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju s pušenjem bez obzira na vrstu izloženosti.

6. Analiza MIP, IHIP i IIP kroz kategorizaciju histoloških i imunohistokemijskih promjena otkriva intoksicirane posteljice koje bi, s obzirom da se neonatološki i makroskopski parametri nisu pokazali značajno promijenjenima, bile smatrane neizloženima utjecaju duhanskog dima tijekom gestacijske dobi.
7. MIP, IHIP i IIP omogućuju rano otkrivanje rizične novorođenčadi koja zbog štetnih intrauterinih učinaka duhanskog dima zahtijevaju pojačanu skrb sve do razdoblja odrasle dobi.

8. SAŽETAK

S obzirom na naviku pušenja, 290 roditelja podijeljeno je u četiri skupine: OP – roditelje nisu pušile tijekom trudnoće, PP – roditelje nisu pušile tijekom trudnoće, ali su bile izložene pasivnom pušenju, AP – roditelje su aktivno pušile tijekom trudnoće, ali nisu njihovi partneri niti ukućani, KP – roditelje su aktivno pušile tijekom trudnoće kao i njihovi partneri i/ili ukućani. Svaka roditelja je ispunila anketu, te su izuzeti uzorci posteljica radi patohistološke i imunohistokemijske analize s p53, bcl-2, Hsp70 i metalotioneinom na temelju čega su formirani morfološki indeks posteljice (MIP), imunohistokemijski indeks posteljice (IHIP), te intoksikacijski indeks posteljice (IIP) kao zbroj MIP i IHIP. Na temelju novorođenačkih pokazatelja i makroskopskih značajki posteljice, nije bilo moguće razlikovati novorođenčad i posteljice izložene intrauterino duhanskom dimu od neizloženih. Histološkom i imunohistokemijskom analizom kroz MIP, IHIP i IIP bilo je moguće razlikovati posteljice koje su tijekom gestacijske dobi bile izložene duhanskom dimu na način da su MIP, IHIP i IIP razlikovali neizložene od izloženih štetnom utjecaju, dok su MIP i IIP razlikovali i način izlaganja s obzirom da su značajno različite vrijednosti parametara pokazale razliku između pasivne i aktivne, ali ne i aktivne od kombinirane izloženosti. Stoga MIP, IHIP i IIP mogu poslužiti kao pokazatelji intoksikacije posteljica duhanskim dimom.

9. SUMMARY

Indicators of the Intensity of Intoxication of the Term Placenta by Tobacco Smoke.

Two hundred and ninety women who had just given birth were divided into four groups with respect to the smoking habit: OP – women that did not smoke during pregnancy; PP – women that did not smoke during pregnancy but were exposed to passive smoking; AP – women that were active smokers during pregnancy, but their partners or household members were not; KP – women that were active smokers during pregnancy as well as their partners and/or household members. Every woman completed a questionnaire, and placental samples were taken for histopathological and immunochemical analysis with p53, bcl-2, HSP-70 and metallothionein. Placental morphological index (MIP), placental immuno-histochemical index (IHIP) and placental intoxication index (IIP) as the sum total of MIP and IHIP were determined. On the basis of neonatological parameters and macroscopic placental features it was not possible to distinguish between newborns and placentas exposed to tobacco smoke and unexposed ones. Placentas exposed to tobacco smoke during gestation could be distinguished by histological and immunohistochemical analysis through MIP, IHIP and IIP: MIP, IHIP and IIP could distinguish unexposed placentas and placentas exposed to harmful influences, while MIP and IIP also distinguish the mode of exposure because of the significantly different values of the parameters that showed a difference between passive and active exposure, but not between active and combined exposure. Accordingly, MIP, IHIP, and IIP can be used as indicators of placental intoxication by tobacco smoke.

Irena Novosel

2014

10. LITERATURA

1. Lewis SH, Benirschke K. In Sternberg SS. Histology for Pathologists, Second Edition, Lippincott-Raven, New York, 1997.p. 961-91.
2. Bartholomew RA, Colvin ED, Grimes WH, Fish JS, Lester WM, Galloway WH. Criteria by which toxemia of pregnancy may be diagnosed from unlabeled formalin-fixed placenta. Am J Obstet Gynecol 1961;82:277-290.
3. Kos M, Jukić S. Bolesti posteljice. In Jukić S: Patologija ženskog spolnog sustava. Zagreb, 1999. p.269-299.
4. Holbrook JH. Tobacco . IN Harrison ´s Principles of internal medicine 11th ed. Vol 1.Eugene Braunwals, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS editors. Mc Graw – Hill book company. p. 855-859.
5. AADAC Making a Difference. Effects Series: Tobacco. http://corp.aadac.com/for_women/the_basics_about_women/women_effects_to_bacco...08.01.2007.
6. Mulcahy S. The toxicology of Cigarette Smoke and Enviromental Tobacco Smoke. A review of Cigarette Smoke and it´s toxicological effects. <http://www.csn.ul.ie/stephen/reports/bc4927.html> 18.10.2006
7. United States Department of Health and Human Services. The Health Concequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. <http://www.surgeongeneral.gov/library/secondhandsmoke/report/> 05.03.2007.
8. Hrubá D, Kachlik P. Influence of maternal active and passive smoking during pregnancy on birthweight in newborns. Cent Eur J Public Health 2000;8:249-52.
9. Windham GC, Eaton A, Hopkins B. Evidence for an association between enviromental tobacco smoke exposure and birthweight: a meta-analysis and new data. Paediatr Perinat Epidemiol 1999;13:35-57.
10. Dybing E, Sanner T. Passive smoking, sudden infant death syndrome (SIDS) and childhood infections. Hum J Exp Toxicol 1999;18:202-205.
11. Buck GM, Cookfair DL, Michalek AM. Intrauterine growth retardation and risk of sudden infant death syndrome (SIDS), Amer J Epidemiol 1989;129:874-883.
12. Ellard GA, Johnstone FD, Prescott RJ. Smoking during pregnancy: the dependence of birthweight deficit. Brit Obstet Gynecol 1996;103:806-813.

13. Haglund B, Cnattingius S. Cigarette smoking as a risk factor for sudden infant death syndrome: a population-based study. *Amer J Publ Hlth* 1990;80:29-32.
14. Oyen N, Skjaerven R, Irgens LM. Maternal smoking, birth-weight and gestational age in sudden infant death syndrome (SIDS) babies and their surviving siblings. *Paed Perinat Epidemiol* 1997;11(Suppl 1):84-97.
15. Larsen LG, Clause HV, Jonsson L. Stereologic examination of placentas from mother who smoke during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:531-7.
16. Luciano A, Bolognani M, Biondani P, Ghizzi C, Zoppi G, Signori E. The influence of maternal passive and light active smoking on intrauterine growth and body composition of the newborn. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:760-3.
17. Stohs SJ, Bagchi D, Bagchi M. Toxicity of trace elements in tobacco smoke. *Inhal Toxicol* 1997;9:867-90.
18. Bush PG, Mayhew TM, Abramovich DR, Aggett PJ, Burke MD, Page KR. A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta* 2000;21:247-256.
19. Kingdom JCP, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 1997;18:613-621.
20. Jackson MR, Joy CF, Mayhew TM, Haas JD. Stereological studies on the true thickness of the villous membrane in human term placentae: a study of placentae from high-altitude pregnancies. *Placenta* 1985; 6:249-258.
21. Reshetnikova OS, Burton GJ, Milovanov AP. Effects of hypobaric hypoxia on the fetoplacental unit: the morphometric diffusion capacity of the villous membrane at high altitude. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1569-1565.
22. Larsen LG, Clausen HV, Jonsson L. Stereological examination the placenta from women who smoke during pregnancy. *Placenta* 1116b;14:A40.
23. Mochizuki M, Mamo T, Masuko K, Ohtsu T. Effects of smoking on fetoplacental maternal system during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149:413-420.
24. Burton GJ, Palmer ME, Dalton KJ. Morphometric differences between the placental vasculature of non-smokers, smokers and ex-smokers. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96:907-915.
25. Ronco AM, Arguello G, Munoz L, Gras N, Llanos M. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals* 2005;18:233-241.

26. Goyer RA. Transplacental transfer of lead and cadmium. In: Goyer RA, Cherian MG, eds. Toxicology of metals. Biochemical aspects. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1995:1-17.
27. Lagerkvist BJ, Nordberg GF, Soderberg HA, Ekesrydh S, Englyst V, Gustavsson M, Gustavsson NO, Wiklund DE. Placental transfer of cadmium. IARC Sci Publ 1992;118:287-91.
28. Levin AA, Kilpper RW, Miller RK. Fetal toxicity of cadmium chloride: the pharmacokinetics in the pregnant Wistar rat. Teratology 1987;36:163-70.
29. Hazelhoff Roelfzema W, Zahn-Breidenbach U, Copius Peereboom-Stegeman JHJ. Light and electron microscopic investigation of the rat placenta after cadmium administration during pregnancy. Anat Embryol 1988;178:345-51.
30. Breen JG, Nelson E, Miller RK. Cellular adaptation to chronic cadmium exposure – intracellular localization of metallothionein protein in human trophoblast cells (JAr). Teratology 1995; 5:266-72.
31. Bremner J. Nutritional and physiologic significance of metallothionein. Methods Enzymol 1991;205:25-35.
32. Kuhnert BR, Kuhnert PM, Lazebnik N, Erhard P. The relationship between cadmium, zinc, and birth weight in pregnant women who smoke. Am J Obstet Gynaecol 1987;157:1247-1251.
33. Piasek M, Blanuša M, Kostial K, Laskey JW. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. Reproductive toxicology 2001;15:673-681.
34. Allen LH. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. J Nutr 2001;131:581S-589S.
35. Godfrey KM, Redman CW, Barker DJ, Osmond C. The effects of maternal anaemia and iron deficiency on the ratio of fetal weight to placental weight. Br J Obstet Gynaecol 1991;98:886-891.
36. Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, Rucker RB. Effects of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. Am J Clin Nutr 1998;67:1003S-1011S.
37. Torjussen W, Zachariasen H, Andersen I. Cigarette smoking and nickel exposure. J Environ Monit 2003;5:198-2001.

38. Georgieff MK, Wobken JK, Welle J, Burdo JR, Connor JR. Identification and localization of divalent metal transporter-1(DMT-1) in term human placenta. *Placenta* 2000; 21:799-804.
39. Schneider BD, Leibold EA. Effects on iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood* 2003;102:3404-3411.
40. Votavova H, Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Fejglova K, Vasikova A, Pastorkova A, Tabashidze N, Topinka J, Balascak I, Sram RJ, Brdicka R. Deregulation of gene expression induced by enviromental tobacco smoke exposure in pregnancy. *Nicotine and Tobacco Research* 2012; 9:1073-82.
41. Rossner P Jr, Mrhalkova A, Uhlirova K, Spatova M, Rossnerova A, Libalova H, Schmuczerova J, Milcova A, Topinka J, Sram RJ. Nucleotide excision repair is not induced in human embryonic fibroblasts treated with enviromental pollutants. *PloS One* 2013; 8:e69197.
42. Votavova H, Merkerova Dostalova M, Fejglova K, Vasikova A, Krejcik Z, Pastorkova A, Tabashidze N, Topinka J, Veleminsky Jr. M, Sram RJ, Brdicka R. Transcriptome alterations in maternal and fetal cells induced by tobacco smoke. *Placenta* 2011;32:763-770.
43. Joubert BR, Haberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, Huang Z, Hoyo C, Midttun Q, Cupul-Uicab LA, Ueland PM, Wu MC, Nystad W, Bell DA, Paddada SD, London SJ. 450 epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Enviromental Health Perspect* 2012;120:1425-31.
44. Slatter TL, Park L, Anderson K, Lillai-Tasmania V, Herbison P, Clow W, Royds JA, Devenish C, Hung NA. Smoking during pregnancy causes double-strand DNA break damage to the placenta. *Human Pathology* 2014;45:17-26.
45. Suter M, Ma J, Harris A, Patterson L, Brown KA; Shope C, Showalter L, Abramovici A, Aagaard-Tillery KM. Maternal tobacco use modestly alters correlated epigenome-wisw placental DNA methylation and gene expression. *Epigenetics* 2011;6:1284-94.
46. Patil VK, Holloway JW, Zhang H, Ramirez NS, Ewart S, Arshad SH, Kamaus Wilfried. Interaction of prenatal maternal smoking, interleukin 13 genetic variants and DNA methylation influencing airflow and airway reactivity. *Clinical Epigenetics* 2013;5:22.

47. Lin S, Huo Z, Zhang Q, Fn X, Du L, Xu X, Qiu S, Zhang Y, Wang Y, Gu J. Short Placental Telomere was associated with cadmium pollution in an electronic waste recycling town in china. *Plos One*; 2013; e60815.
48. Perera FP, Tang D, Rauh V, Tu YH, Tsai WY, Becker M, Stein JL, King J, Del Priore G, Lederman SA. Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, enviromental tobacco smoke, and child development in the world trade center cohort. *Enviromental Health Perspectives* 2007; 15:1497-1502.
49. Hakonsen LB, Ernst A, Ramlau-Hansen CH. Maternal cigarette smoking during pregnancy and reproductive health in children: a review of epidemiological studies. *Asian Journal of Andrology* 2014; 16:39-49.
50. Hakonsen LB, Olsen J, Stovring H, Ernst A, Thulstrup AM, Zhu JL, Shrestha A, Ramlau-Hansen CH. Maternal cigarette smoking during pregnancy and pubertal development in sons. A follow-up study of a birth cohort. *Andrology* 2013;1:348-55.
51. Axelsson J, Rylander L, Rignell-HydbomSilfver KA, Stenqvist A, Giwercman A. The impact of paternal and maternal smoking on semen quality of adolescent men. *Plos one* 2013; 6:e66766.
52. Anderson RA, Mcllwain L, Coutts S, Kinnell HL, Fowler PA, Childs AJ. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by a component of cigarette smoke reduces germ cell proliferation in the human fetal ovary. *Molecular Human Reproduction* 2014;1:42-8.
53. Ernst A, Kristensen SL; Thulstrup AM, Hakonsen LB, Olsen SF, Ramlau-Hansen CH. Maternal smoking during pregnancy and reproductive health of daughters: a follow-up study spanning two decades. *Human Reproduction* 2012;12:3593-3600.
54. Ravnborg TL, Jensen TK, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek NE, jorgensen N. Prenatal and adult exposures to smoking are associated with adverse effects on reproductive hormones, semen quality, final height and body mass index. *Human Reproduction* 2011;5:1000-11.
55. Ejaz S, Seok KB, Woong LC. Toxicological effects of mainstream whole smoke solutions on embryonic movements of the developing embryo. *Drug and chemical toxicology* 2005; 1:1-14.
56. Rama S, Rao AJ. Regulation of growth and function of the human placenta. *Mol Cell Biochem* 2003;253:263-8.

57. Morrish DW, Dakour J, Li H. Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal. *Curr Protein Pept Sci* 2001;2:245-59.
58. Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 2002;19:3-11.
59. Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth hormon IGF Res* 2003;13(supl A):S34-7.
60. Marzusch K, Ruck P, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E. Expression of the p53 tumour supressor gene in human placenta: an immunohistochemical study. *Placenta* 1995;16:101-4.
61. Lane DP. Mutation of the p53 protein: common steps found in the majority of human cancers. In *Accomplishments in Cancer research*. (Ed.) Fortner JG, Rhodes Je, 1990. pp. 256-266. Philadelphia: JP Lippincot.
62. Jeschke U, Schiessl B, Mylonas I, Kunze S, Kuhn C, Schulze S, Friese K, Mayr D. Expression of the proliferation marker Ki-67 and of p53 tumor protein in trophoblastic tissue of preeclamptic, HELLP, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Int J Gynecol Pathol*; 2006;4:350-60.
63. Qiao S, Nagasaka T, Harada T, Nakashima N. P53, Bax i Bcl-2 expression, and apoptosis in gestational trophoblast of complete hydatidiform mole. *Placenta* 1998;19:361-69.
64. Roncalli M, Bulfamante G, Viale G, Sprinall DR, Alfano R, Romi A, Maggioni M, Polak JM, Coggi G. c-myc and tumour suppressor gene product expression in developing and term human trophoblast. *Placenta* 1994;15:399-409.
65. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today* 1993;14:582-90.
66. Wong SY, Ngan HYS, Chan CCW, Cheung ANY. Apoptosis in gestational trophoblastic disease is correlated with clinical outcome and bcl-2 expression but not bax expression. *Mod Pathol* 1999;12:1025-33.
67. Danihel L, Gomolčák P, Korbel M, Pružinec J, Vojtaššák J, Janik P, Babal P. Expression of proliferation and apoptotic markers in human placenta during pregnancy. *Acta Histochemica* 2002;104:335-8.
68. Smith SC, Baker PN, Symmonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997b;177:1395-1401.

69. Milnerowicz H, Chmerek M. Influence of smoking on metallothionein level and other proteins binding essential metals in human milk. *Acta Paediatrica* 2005;94:402-6.
70. Halatek T, Chmielnicka J. Evaluation of nephrotoxicity of cadmium in laboratory animals and humans. *Post Hig Med Dosw* 1993;47:375-91.
71. Milnerowicz H, Tymaska A, Zaslawski R. The dynamics of metals, metallothionein, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase excretion with maternal milk in environmental exposure to tobacco smoke. Conference Proceedings: „Children in the Contaminated Environment: Ecological and Health Problems“ legnica, Poland:1997. p.159-63.
72. Brzozowska A. Harmful elements versus iron, zinc and copper: interactions in the animal and human organism. Part III. Cadmium. *Roczn PZH* 1991;42:269-74.
73. Groten JP, Sinkeldam EJ, Luten JB, Van Bladeren PJ. Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metallothionein in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;111:504-13.
74. Dais SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr* 2000;130:1085-8.
75. Ebadi M, Luschen MP, El Refaey H, Hamada FM, Rojas P. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem Int* 1996;29:159-66.
76. Wellinghausen N. Immunobiology of gestational Zn deficiency. *Br j Nutr.* 2001;85:S81-S86.
77. Hamadani JD, Fuchs GJ, Osendarp SJ, Huda SN, Grantham-McGregor SM. Zn supplementation during pregnancy and effects on mental development and behavior of infants: a follow-up study. *Lancet* 2002;360:290-294.
78. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol* 1999;39:267-294.
79. Ronco AM, Arguello G, Suazo M, Llanos MN. Increased levels of metallothionein in placenta of smokers. *Toxicology* 2005;208:133-139.
80. Becker C, Craig EA. Heat shock proteins as molecular chaperones. *Br J Biochem* 1994;219:185-90.
81. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988;22:631.

82. Massa SM, Longo FM, Zuo J, Wang S, Chen J, Sharp FR. Cloning of rat grp 75 an HSP70-family member, and its expression in normal ischemic brain. J Neuro Res 1995;40:807.
83. Udelsman R, Blake MJ, Stagg Ca, Li DG, Putney DJ, Holbrook NJ. Vascular heat shock protein expression in response to stress. J Clin Invest 1993;91:465.
84. Sotirou S, Liatsos K, Ladopoulos I, Arvanitis DL. A comparison in concentration of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 on chorionic villi of human placenta in normal pregnancies and in missed miscarriages. Clin Exp Obst and Gyn2004;31:185-90.
85. Wu WX, Derks JB, Zhang Q, Nathanielsz PW. Changes in heat shock protein-90 and -70 messenger ribonucleic acid in uterine tissues of the ewe in relation to parturition and regulation by estradiol and progesterone. Endocrinology 1996;12:5685-93.
86. www.tobaccoatlas.org... 20.04.2014.
87. [www.globalink.org/tobacco/trg/Chapter19/Chap19_ingredients_Additives ...18.10.2006](http://www.globalink.org/tobacco/trg/Chapter19/Chap19_ingredients_Additives...18.10.2006).
88. Li Z, Zeki R, Hilder L, Sullivan E. Australia's mothers and babies 2010. Perinatal statistics series no. 27 Cat. no. PER 57. Canberra: AIHW National Perinatal Epidemiology and Statistics Unit. Available at www.aihw.gov.au/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=060129542372
89. mhtml:file://Users \Irena \AppData \Local \Temp \Ra\$DI57.994 \MMWR Sur a. Summ 2009..mht 6.8.2013.
90. Albrecht SA, Maloni JA, Thomas KK, Jones R, Halleran JA, Osborne J. JOGNN 2004; 3:298-305.
91. www.bedford.gov.uk/health_and_social_care/bedford_borough_jsna/starting_well/smoking_in_pregnancy.aspx
92. Fenercioglu AK, Yildirim G, Karatekin G, Goker N. The relationship of gestational smoking with pregnancy complications and sociodemographic characteristics of mothers. J Turkish-German Gynecol Assoc 2009;10:148-51.
93. Villabi JR, Salvador J, Cano-Serral G, Rodriguez-Sanz MC, Borell C. Maternal smoking, social class and outcomes of pregnancy. Paediatr Perinat Epidemiol 2007; 21:194-200.
94. Zimmer MH, Zimmer M. Socioeconomic determinants of smoking behavior during pregnancy. The Social Science Journal 1998;35:133-42.

95. Goodwin RD, Keyes K, Simuro N. Mental disorders and nicotine dependence among pregnant women in the United States. *Obstet Gynecol* 2007;109:875-83.
96. Ward C, Lewis S, Coleman T. Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millenim Cohort. *BMC Public Health* 2007;7:1-6.
97. Dejmek J, Solansky I, Podrazilova K, Šram RJ. The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth. *Environmental Health Perspectives* 2002;6:601-6.
98. Blizzard L, Ponsonby AL, Dwyer T, Venn A, Cochrane JA. Parental smoking and infant respiratory infection: how important is not smoking in the same room with the baby? *Am J Public Health* 2003;93:482-88.
99. Leung GM, Ho L, Lam T. Secondhand smoke exposure, smoking hygiene, and hospitalization in the first 18 months of life. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004;158:687-93.
100. Lavezzi AM, Corna MF, Alfonsi G, Maturri L. Possible role of the $\alpha 7$ nicotinic receptors in mediating nicotine's effect on developing lung – implications in unexplained human perinatal death. *BMC Pulmonary Medicine* 2014;11:1-9
101. Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 1960;35:544-7.
102. Heinonen S, Taipale P, Saarikoski S. Weights of placentas from small for gestational infants revisited. *Placenta* 2001;22:399-404.
103. Biswas S, Ghosh SK. Gross morphological changes of placentas associated with intrauterine growth restriction of fetuses: a case control study. *Early Hum Dev* 2008;84:357-62.
104. Sornes T. Umbilical cord knots. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:157-9.
105. Rocha JES, Matheus M, Sala MA. Effect of smoking on human placenta morphometry. *Int J Gyn Obstet* 1998;62:237-42.
106. Vedmedovska N, Rezeberga D, Teibe U, Melderis I, Donders GGG. Placental pathology in fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2011;155:36-40.
107. Salafia CM, Charles AK, Maas EM. Placenta and fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49:236-56.

108. Rennie MY, Detmar J, Whiteley KJ, Yang J, Jurisicova A, Adamson SL, Sled JG. Vessel tortuosity and reduced vascularization in the fetoplacental arterial tree after maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:675-84.
109. Fridman Y, Pizer SM, Aylward S, Bullit E. Extracting branching tubular object geometry via cores. *Med Image Anal* 2004; 8:169-176.
110. Rizzo F, Capponi A, Pietrolucci ME, Arduini D. Effects of maternal cigarette smoking on placental volume and vascularization measured by 3-dimensional power Dopple ultrasonography at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:415e1-415e5.
111. Akbulut M, Sorku AC, Bir F, Eralp A, Duzcan E. Chorangiosis: The potential role of smoking and aire pollution. *Pathology – Research and Practise* 2009; 205:75-81.
112. Gupta R, Nigam S, Arora P, Khurana N, Batra S, Mandal AK. Clinico-pathological profile of 12 cases of chorangiosis. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 274:50-53.
113. Asmussen I. Ultrastructure of the villi and fetal capillaries in placentas from smoking and nonsmoking mothers. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87:239-245.
114. Zdravkovic T, Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. The Adverse Effects of Maternal smoking on the Human Placenta: A Review. *Placenta* 2005;26:81-6.
115. Menon R, Fortunato SJ, Yu J, Milne GL, Sanchez S, Drobek CO, Lappas M, Taylor RN. Cigarette smoke induces oxidative stress and apoptosis in normal term fetal membranes. *Placenta* 2011;32:317-22.
116. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J obstet Gynecol* 2000;6:1468-1476.
117. Sbrana E, Suter MA, Abramovici AR, Hawkins HK, Moss JE, Patterson L, Shope C, Aagaard-Tillery K. Maternal tobacco use is associated with increased markers of oxidative stress in the placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:246e1-246e7.
118. Lim R, Sobey CG. Maternal nicotine sxposure and fetal programming of vascular oxidative stress in adult offspring. *British Journal of Pharmacology* 2011; 164:1397-99.

119. Bruin JE, Gerstein HC, Holloway AC. Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure increases oxidative stress in the offspring: a critical review. *Toxicol Sci* 2007;364-74.
120. Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L. Antenatal nicotine induces heightened oxidative stress and vascular dysfunction in rat offspring. *Br J Pharmacol* 2011;164:1400-9.
121. Sorkun HC, Bir F, Akbulut M, Divrikli U, Erken G, Demirham H, Duzcan E, Elci L, Celik I, Yozgatli U. The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression. *Toxicology* 2007; 238:15-22.
122. Kippler M, Waheedul Hoque AM, Raqib Rubhahana, Ohrvik H, Ekstrom E-C, Vahter M. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicology Letters* 2009;2010:162-168.
123. Alvarez MM, Chakraborty C. Cadmium inhibits motility factor-dependent migration of human trophoblast cells. *Toxicology in Vitro* 2011;25:1926:33.
124. Zhang Q, Zhou T, Xu X, Yongyong G, Zhiguo Z, Min Z, Li W, Yi D, Huo X. downregulation of placental S100P is associated with cadmium exposure in Guiyu, an e-waste recycling town in China. *Science of the Environment* 2011;410-411:53-58.
125. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:637-68.
126. De SK, Sey SK, Andrews GK. Cadmium teratogenicity and its relationship with metallothionein gene expression in midgestation mouse embryos. *Toxicology* 1990;64:89-104.
127. Garcia-Esquinas E, Perez-Gomez B, Fernandez-Navarro P, Fernandez MA, de Paz C, Perez-Meixeira AM, Gil E, Iriso A, Sanz JC, Astray J, Cisneros M, de Santos M, de Santos A, Asensio A, Garcia-Sagredo JM, Garcia JF, Vioque J, Lopez-Abente G, Pollan M, Gonzalez MJ, Martinez M, Aragones N. Lead, mercury and cadmium in umbilical cord blood and its association with parental epidemiological variables and birth factors. *BMC Public Health* 2013;13:1-11.
128. Nakamura Y, Ohba K-i, Suzuki K, Ohta H. Health effects of low level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus. *J Toxicol Sci* 2012;1:149-56.

129. Jo SK, Ko BJ, Boo CS, Cho WY, Kim HK. Heat preconditioning attenuates renal injury in ischemic ARF in rats: role of heat-shock protein 70 on NF-kappaB-mediated inflammation and on tubular cell injury. *J Am Soc Nephrol* 17:3082-3092.
130. Luft JC, Dix DJ. Hsp 70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress Chaperones* 1999; 4:162-170.
131. Molvarec A, Tamasi Lilla, Losonczy G, Madach K, Prohaszka Z, Rigo J. Circulating heat protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress and Chaperones* 2010; 15:237-247.
132. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381:571-9.
133. Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta 1 in a coculture system. *Clin Exp Med* 2009;10:159-167.
134. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle* 2009;8:518-526.
135. Bachelet M, Pinot F, Polla RI, Francois D, Richard M-J, Vayssier-Taussat M, Polla BS. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. *Free Radical Research* 2002;36:99-106.
136. Abulsid A, Hanretty K, Lyall F. Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia. *PLOS ONE* 2013;1:1-7
137. Vayssier M, Banzet N, Francois D, Bellmann K, Polla BS. Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70. *Am J Physiol* 1998;275:L771-9.
138. Ekambaram P. HSP 70 Expression and its Role in Preeclamptic Stress. *Indian J Biochem Biophys* 2011;48:243-255.
139. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280:38729-39.

16. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 4. rujna 1967. u Sisku, gdje pohađam osnovnu školu i Gimnaziju. Diplomirala sam 1996. na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, 1999. položila Državni ispit, 2003. položila Specijalistički ispit iz Patološke anatomije, 2009. položila Specijalistički ispit iz Sudske medicine, 2014. stekla naslov Primarijusa.

Stručni poslijediplomski studij iz Patološke anatomije pohađam 2000/2001., te 2003/2004. upisujem trogodišnji Doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo pri Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Od 1999. u stalnom sam radnom odnosu na Odjelu patologije OB „Dr Ivo Pedišić“ u Sisku. Stalni sam sudski vještak medicinske struke za područje sudske medicine i patologije od 2009. Član sam Povjerenstva za nadzor nad radom mrtvozorničke službe i Koordinator Mrtvozorničke službe Sisačko-moslavačke županije od 2012. Tijekom 2012/2013 i 2013/2014 predajem stručne predmete u Srednjoj školi Viktorovac u Sisku.

Pohađala sam: 2003. Course of Surgical Pathology, Harvard Medical School, L'instituto dei tumori, Milano, Italia; 2004. Breast Pathology: Current Concepts and Controversies, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; 2006. Dijagnostika, liječenje i prognoza preinvazivnih lezija i karcinoma vrata maternice, Klinika za ženske bolesti i porode, Zagreb, Hrvatska; 2007. Dijagnostika, liječenje i prognoza zloćudnih tumora jajnika, Klinika za ženske bolesti i porode, Zagreb, Hrvatska

Autor sam i koautor 24 izvorna članka od kojih je 6 indeksirano u Current Contents, te 15 kongresnih sažetaka.

17. DODACI

ANKETNI LIST - A	No. 1
I. dio : Opći podaci - MAJKA	
Ime i prezime	
Dob	
Stručna sprema	
Zanimanje	
Zaposlenost	DA-NE
Prebivalište	
Kontakt telefon	
Bračno stanje	
Trajanje bračne/izvanbračne zajednice	
Broj članova kućanstva	
Veličina stana	
Broj djece	
Dob djece	
Djeca su rođena:	a) porod je bio na vrijeme b) prijevremeni porod
Broj poroda	
Broj pobačaja	a) spontani – broj b) namjerni-broj
Problem očuvanja prethodnih trudnoća	DA-NE
Problem začeća prethodnih trudnoća	DA-NE
Krvna grupa	A B AB O
Nasljedne bolesti u obitelji	DA-NE
Nabrojite ako da:	
Napomena:	

II. dio: Sadašnja trudnoća	
Zdravstveno stanje prije trudnoće (Uputa: Pod b) navedite teže akutne bolesti, infekcije, kronične bolesti, operativne zahvate)	a) dobro b)
Zdravstveno stanje za vrijeme trudnoće (Uputa: Pod b) navedite teže akutne bolesti, infekcije, kronične bolesti, operativne zahvate)	a) dobro b) ...
Lijekovi za vrijeme trudnoće	DA-NE
Navedite koji:	
Problemi očuvanja trudnoće	DA-NE
Liječenje, ako da, navedite:	
Problemi začeća	DA-NE
Liječenje, ako da, navedite:	
Konзумiranje alkohola za vrijeme trudnoće	DA-NE
Težina prije sadašnje trudnoće	Kg
Težina na kraju trudnoće	Kg
Prehrana za vrijeme trudnoće	a) vegetarijanska b) makrobiotika c) mješovito, pretežito voće d) mješovito, pretežito povrće e) mješovito, pretežito meso f) mješovito, pretežito tjestenina
Nadopuna prehrane vitaminima	DA-NE
Nadopuna prehrane željezom	DA-NE
Nadopuna prehrane kalcijem	DA-NE
Nadzor sadašnje trudnoće	a) liječnik bolnice u kojoj ste rodili b) ginekolog iz primarne zdravstvene zaštite c) privatni ginekolog
Broj obroka dnevno	1 2 3 4 5
Sportske aktivnosti za vrijeme trudnoće	a) NE b) rijetko c) ponekad d) redovno e) svakodnevno
Jesu li informacije o štetnosti aktivnog/pasivnog pušenja za vrijeme trudnoće dovoljno prisutne u javnim medijima?	DA-NE
Je li Vas ginekolog koji prati trudnoću upozorio o štetnosti aktivnog/pasivnog pušenja za vrijeme trudnoće?	DA-NE

III. dio: Navika pušenja- MAJKA	
MAJKA- Aktivno pušenje prije sadašnje trudnoće	DA-NE
Ako da, koliko dugo:	
Ako da, broj cigareta/dan:	a) 1-5 b) 6-10 c) 11-15 d) 16-20 e) više od 20
Ako da, vrsta cigareta:	
MAJKA- Aktivno pušenje za vrijeme sadašnje trudnoće	DA-NE
Ako da, broj cigareta/dan:	a) 1-5 b) 6-10 c) 11-15 d) 16-20 e) više od 20
Ako da, vrsta cigareta:	
Razlozi za prestanak pušenja:	a) neovisno o trudnoći i zdravlju b) trudnoća c) planiranje trudnoće d) zdravstveni razlozi
Za vrijeme trudnoće ste odlučili prekinuti pušiti, ali ćete nastaviti nakon poroda.	
DA-NE	
MAJKA- Pasivno pušenje (Udisanje duhanskog dima u zatvorenom prostoru u kojemu boravite)	DA-NE
Ako da, broj cigareta/dan:	a) 1-5 b) 6-10 c) 11-15 d) 16-20 e) više od 20
Ako da, broj sati izloženosti:	a) 1-2 h b) 3-5 h c) 5-10 h d) više od 10 h
Napomena:	

IV. dio: Opći podaci - PARTNER		
Dob		
Stručna sprema		
Zaposlenost		
Zanimanje		
Alkohol		DA-NE
V. dio: Navika pušenja - PARTNER		
Partner je pušač		DA-NE
Partner puši u Vašoj nazočnosti tijekom trudnoće		DA-NE
Ako da, broj cigareta/dan:	a) 1-5 b) 6-10 c) 11-15 d) 16-20 e) Više od 20	
Ako da, vrsta cigareta:		
Partner je prestao pušiti u Vašoj nazočnosti od kada ste zatrudnjeli		DA-NE
VI. dio: Navika pušenja -UKUĆANI		
Ukućani puše u Vašoj nazočnosti za vrijeme trudnoće		DA-NE
Ako da, broj cigareta/dan:	a) 1-5 b) 6-10 c) 11-15 d) 16-20 e) Više od 20	
Ako da, vrsta cigareta:		

Napomena:

ANKETNI LIST –B	Ime i prezime:
VII. dio: Tijek poroda	
Način	
Stav	
Lijekovi	
Komplikacije za vrijeme trudnoće	
Komplikacije za vrijeme poroda	
Babinje	
VIII. dio: Status novorođenčeta	
Spol	
Gestacijska dob	
Apgar-1.min.	
Apgar-5. min.	
Dužina	
Težina	
BMI (kg/m ²)	
Opseg glavice (frontotookcipitalni opseg)	
Posebnost nalaza	
Dijagnoze kod otpusta	

Napomena:

ANKETNI LIST - C	Ime i prezime:
	Broj biopsije:
IX. dio: Posteljica- Makroskopska analiza	
Veličina posteljice	,
Oblik posteljice	a) ovalna b) okrugla c) srcolika d) bubrežasta e) ostalo
Akutni infarkti	DA-NE
Kronični infarkti	DA-NE
Krvni podljevi	DA-NE
Dužina pupkovine	
Insercija pupkovine	a) centralna b) paracentralna c) periferna d) velamentozna
Poremećaji pupkovine	a) pravi čvorovi b) lažni čvorovi c) varikoziteti d) torzija
Ovoji	a) glatki b) zamućeni c) zadebljani d) prožeti mekonijem e) ostalo
Napomena	

X. dio: Posteljica- Mikroskopska analiza	
Zrelost	DA-NE
Akutni infarkt	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Kronični infarkt	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Perivilozni fibrin	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Intervilozni fibrin	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Tromboza spiralnih arterija	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Hematomi	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Kalcifikati	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Korionske resice - povećanje gustoće /razgranatosti	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Fetalne kapilare - povećanje broja	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Fetalne kapilare - povećanje promjera	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Uteroplacentarna membrana -zadebljanje bazalne membrane fetalnih kapilara	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3

Uteroplacentarna membrana -fibroza strome resica	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Uteroplacentarna membrana -citotrofoblast oblaže ...% korionskih resica	više od 75% 50-75% 30-50% do 30%
Uteroplacentarna membrana - proliferacija citotrofoblasta	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Uteroplacentarna membrana -prisutnost sincicijskih čvorića	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Uteroplacentarna membrana -povećanje efektivne difuzijske udaljenosti	DA-NE
	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
XI. dio. Imunohistokemijska analiza	
HSP 70	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Metalotionein	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
Bcl-2	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3
p53	Difuznost: 0 1 2 3 Intenzitet: 0 1 2 3

Napomena: